

Identifikation von *in vivo* essentiellen Genen bei *Helicobacter pylori*

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Holger Kavermann
aus Melle

München 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. Volker Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Overmann

Tag der mündl. Prüfung: 29.04.03

Abkürzungen

A	Ampere
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-Dinatriumsalz
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Celsius
Cam	Chloramphenicol
<i>cat</i>	Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase
<i>cat</i> _{GC}	Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase mit <i>opa</i> -Promotor aus Gonokokken und fd-Terminator
cfu	Kolonie-bildende-Einheiten
C-Terminus	Carboxyterminaler Teil eines Proteins
Da	Dalton
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Desoxy-Adenosintriphosphat, -Cytidintriphosphat, -Guanosintriphosphat, -Thymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Farad
FCS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigungszahl
h	Stunde
<i>hp</i> , HP	Gen, Protein des Stammes <i>H. pylori</i> 26695 (Tomb <i>et al.</i> , 1997)
GST	Glutathion-S-Transferase
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
IR	invertierte Sequenzwiederholung
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter

Abkürzungen

<i>jhp</i> , JHP	Gen, Protein des Stammes <i>H. pylori</i> J99 (Alm <i>et al.</i> , 1999)
log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
N-Terminus	Aminoterminaler Teil eines Proteins
OD _x	Optische Dichte bei x nm Wellenlänge
<i>ori</i> _{ColE1}	Replikationsursprung des ColE1-Replikons
ORF	offener Leserahmen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
peripl.	periplasmatisch
R	Resistenz, resistent
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Strep	Streptomycin
T _m	Schmelztemperatur
Tn	Transposon
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethyl-1,3-Propanediol
U	Enzymeinheit
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumenprozent bei Lösungen
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent bei Lösungen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Thiogalactopyranosid

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie und Pathogenese der <i>H. pylori</i> -Infektion	1
1.2	Diagnose und Behandlung von <i>H. pylori</i> -Infektionen	4
1.3	Pathogenitäts- und Kolonisierungsfaktoren von <i>H. pylori</i>	5
1.4	Tiermodelle zur Untersuchung der <i>H. pylori</i> -Infektion	11
1.5	Die Erforschung <i>in vivo</i> essentieller und infektionsrelevanter Gene	14
1.6	Ziele dieser Arbeit	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	21
2.1.1	Bakterienstämme	21
2.1.1.1	<i>Helicobacter pylori</i> -Stämme	21
2.1.1.2	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	21
2.1.2	Plasmide	22
2.1.3	Oligonukleotide	22
2.2	Antikörper	23
2.2.1	Primäre Antikörper	23
2.2.2	Sekundäre Antikörper/Protein A	24
2.3	Nährmedien	24
2.3.1	Nährmedien für <i>Helicobacter pylori</i>	24
2.3.2	Nährmedien für <i>E. coli</i>	25
2.4	Antibiotika und andere Zusätze	25
2.5	Bakterienanzucht	25
2.5.1	Anzucht von <i>H. pylori</i>	25
2.5.2	Anzucht von <i>E. coli</i>	26
2.5.3	Bestimmung der optischen Dichte von Bakterien	26
2.6	Transformation von Bakterien	26
2.6.1	Herstellen elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	26
2.6.2	Herstellen chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen mit RbCl	26
2.6.3	Elektrotransformation von <i>E. coli</i> -Zellen	27
2.6.4	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	27
2.6.5	Transformation von <i>H. pylori</i>	27
2.7	Molekularbiologische Arbeiten	28
2.7.1	Isolierung und Auftrennung von Nukleinsäuren	28
2.7.1.1	Isolierung chromosomaler DNA	28

2.7.1.2	Schnellpräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	28
2.7.1.3	Präparative Plasmidisolierung	29
2.7.1.4	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese	29
2.7.1.5	Reinigung von DNA	29
2.7.1.6	Fällung von Nukleinsäuren	30
2.7.1.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
2.7.2	Enzymatische Modifikation von DNA	30
2.7.2.1	Spaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen	30
2.7.2.2	Ligation von DNA-Fragmenten	31
2.7.3	<i>In vitro</i> -Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.7.3.1	Allgemeine PCR	31
2.7.3.2	Signatur-Detektions-PCR	31
2.7.4	Detektion von Nukleinsäuren durch nicht-radioaktive Southern-Blot-Hybridisierung	32
2.7.5	<i>In vitro</i> -Transposition	33
2.7.6	Klonierung von PCR-Produkten über TOPO-TA-Cloning®	33
2.7.7	DNA-Sequenzierung	34
2.8	Biochemische Arbeiten	34
2.8.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	34
2.8.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.8.3	Fällung von Proteinen	34
2.8.4	Heterologe Überproduktion und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	35
2.8.5	Immuno-Blot	35
2.8.6	Test auf Protease-Aktivität	36
2.8.7	Test auf Kollagenaseaktivität	36
2.8.8	Test auf C1q-Degradation	37
2.8.9	Test auf Ureaseaktivität	37
2.8.10	Test auf Motilität	37
2.9	Tierexperimente	38
2.9.1	Tierhaltung	38
2.9.2	Orogastrale Infektion der Wüstenrennmäuse mit <i>H. pylori</i>	38

2.9.3	Quantitative Reisolierung von <i>H. pylori</i> aus Wüstenrennmaus-	Mägen
		38
2.9.4	Chemikalien und Apparaturen	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Identifikation <i>in vivo</i> essentieller Gene bei <i>H. pylori</i>	40
3.1.1	Validierung eines geeigneten Tiermodells	40
3.1.2	Das Wüstenrennmausmodell ist für die Anforderung einer STM-Mutantensuche geeignet	41
3.1.3	Entwicklung eines PCR-basierenden Detektionssystems zur Identifikation kolonisierender STM Mutanten	43
3.1.4	Konstruktion einer Gruppe von definierten STM-Transposons	44
3.1.5	Begrenzung und Auswahl der unterschiedlich signaturmarkierten TnHK9-Transposons	45
3.1.5.1	Untersuchungen zur Sensitivität und Spezifität der Signatur-Oligonukleotide in der Signatur-Detektions-PCR	47
3.1.6	Konstruktion einer <i>H. pylori</i> -Mutantengenenbank mit molekularen Signaturen	51
3.1.6.1	Konstruktion einer <i>H. pylori</i> -Plasmidgenbank in <i>E. coli</i>	51
3.1.6.2	<i>In vitro</i> -Mutagenese der <i>H. pylori</i> -Genbank	51
3.1.7	Besitzt das Transposon TnHK9 polare Effekte auf die Expression stromabwärts liegender Gene?	54
3.1.8	Untersuchung der signaturmarkierten <i>H. pylori</i> -Mutanten auf Kolonisierungsfähigkeit im Magen von Wüstenrennmäusen	57
3.1.8.1	Identifikation von <i>in vivo</i> essentiellen Genen	61
3.1.8.2	Signifikanz der Daten der STM-Suche nach <i>in vivo</i> essentiellen Genen bei <i>H. pylori</i>	65
3.1.8.3	Bestimmung der kompetitiven Indices (KI) einiger STM-Mutanten	65
3.1.8.4	Untersuchungen zur Motilität und Ureaseaktivität von <i>H. pylori</i> -STM-Mutanten	67
3.1.8.5	Identifikation <i>in vivo</i> nicht essentieller Gene von <i>H. pylori</i>	68
3.1.8.6	Untersuchung zur Häufigkeit falsch klassifizierter Gene in der STM-Suche	71

3.1.9	Einfluss des Eisenspeicherproteins Pfr und der adhäsions- assoziierten äußeren Membranproteine AlpA und AlpB auf die Kolonisierungs-fähigkeit <i>in vivo</i>	72
3.1.9.1	Die natürliche Transformationskompetenz von <i>H. pylori</i> ist für die Kolonisierung nicht essentiell	74
3.1.10	Zyklopropan-Gruppen in der Zytoplasmamembran von <i>H. pylori</i> erhöhen die Resistenz gegen oxidativen Stress	76
3.2	Der ORF HP0169 kodiert eine sekretierte Kollagenase	78
3.2.1	Die Kollagenase PrtC degradiert kein humanes C1q	83
3.2.2	Überproduktion und Reinigung von rekombinantem <i>H. pylori</i> -PrtC	84
4	Diskussion	87
4.1	Signature-tagged-Mutagenesis (STM)	87
4.1.1	Motilität und Säureresistenz: essentielle Faktoren für eine erfolgreiche Kolonisierung	90
4.1.2	<i>In vivo</i> essentielle Transportprozesse	92
4.1.3	Essentielle Kolonisierungsfaktoren der Zellhülle	95
4.1.3.1	Die Gruppe der äußeren Membranproteine	95
4.1.3.2	Die VacA-paralogen Proteine	97
4.1.3.3	Das Lipopolysaccharid	98
4.1.3.4	Die Phospholipidmembran	100
4.1.4	Ein regulierter Eisenhaushalt ist für <i>H. pylori</i> essentiell für das Überleben <i>in vivo</i>	101
4.1.5	Die Gruppe der essentiellen hypothetischen Proteine besitzt ein hohes Potential als Angriffspunkt für spezifische Antiinfektiva	102
4.1.6	Kolonisierung durch Nutzung extrazellulärer Wirtszellproteine	105
4.1.7	Ausblick	108
5	Zusammenfassung	110
6	Literaturverzeichnis	112
7	Anhang	130
7.1	Untersuchungen zur Motilität und Ureaseaktivität von <i>H. pylori</i> - STM-Mutanten	130

1 EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie und Pathogenese der *H. pylori*-Infektion

Helicobacter pylori ist vermutlich das einzige Bakterium, das zu einem andauernden Überleben im menschlichen Magen befähigt ist. Die Kolonisierung des Magens mit diesem Gram-negativen, mikroaerophilen, spiralförmig gewundenen Bakterium ist mit der Entstehung schwerer gastrointestinaler Krankheiten wie aktiver chronischer Gastritis und Geschwüren des Magens und des Zwölffingerdarms assoziiert (Graham, 1991; Kuipers *et al.*, 1995). Darüber hinaus stellt die Infektion einen Risikofaktor für die Entwicklung von Magenadenokarzinomen (The Eurogast Study Group, 1993) und des B-Zell Mukosa assoziierten Lymphgewebe (MALT-)-Lymphoms (Parsonnet *et al.*, 1994) dar.

Die Infektion mit *H. pylori* gilt mittlerweile als die zweithäufigste bakterielle Infektion nach der Karies-verursachenden Infektion mit *Streptococcus mutans*. Etwa 50% aller Menschen sind mit *H. pylori* infiziert, wobei sich sowohl innerhalb als auch zwischen verschiedenen Ländern große Unterschiede zeigen. Während in industrialisierten Ländern die Infektionsrate unter 50% liegt, beträgt sie in einigen Entwicklungsländern über 90% (Dunn *et al.*, 1997). In den Industrieländern steigt dabei die Rate der Infizierten mit dem Alter der untersuchten Population deutlich an, was auf verbesserte Lebensumstände hinsichtlich der medizinischen Versorgung und den Hygienebedingungen zurückgeführt wird. Die Infektion wird in den meisten Fällen in der Kindheit erworben. Einmal infiziert, persistiert *H. pylori* ein Leben lang im Mukus, wenn die Infektion nicht behandelt wird (Cullen *et al.*, 1993). Im Erwachsenenalter hingegen sind Neuinfektionen eher selten. Viele epidemiologische Studien haben ihr Hauptaugenmerk auf die Untersuchung der Risikofaktoren für eine *H. pylori*-Infektion gelegt. Dabei spielt der sozioökonomische Status während der Kindheit eine große Rolle. Die Häufigkeit der *H. pylori*-Infektion ist umgekehrt proportional zum Sozialstatus, wie Malaty und Graham (1994) bei Untersuchungen in verschiedenen sozialen Schichten in den Vereinigten Staaten feststellen konnten. Während die Infektionsrate in der niedrigsten sozialen Schicht bei 85% lag, waren nur 11% der Angehörigen aus der höchsten sozialen Schicht infiziert. Der sozioökonomische Status ist dabei ein

vielschichtiges Kriterium, das sich aus Hygienebedingungen, der räumlichen Enge, Bildungsmöglichkeiten und weiteren Lebensbedingungen zusammensetzt. Untersuchungen haben gezeigt, dass alle genannten Faktoren einen Einfluss auf die Infektionsrate innerhalb einer Bevölkerung haben (Mendall *et al.*, 1992; McCallion *et al.*, 1996). Auch die genetische Prädisposition scheint bei der Infektion eine Rolle zu spielen, wie Untersuchungen an eineiigen Zwillingen gezeigt haben (Malaty *et al.*, 1994).

Der Weg der Übertragung ist nicht endgültig geklärt, und es wird diskutiert, ob der gastro-oralen, oral-oralen oder fäkal-oralen Route der Transmission der Bakterien die wichtigste Rolle zukommt. Das Bakterium besiedelt hauptsächlich die Antralregion des Magens nahe des Pylorus, während es im Corpus bzw. Fundus nur selten gefunden wird.

Die Infektion führt bei den Infizierten zu einer Veränderung der Magenphysiologie: Durch eine Hemmung der Somatostatinsekretion der D-Zellen wird der Gastrin-Level im Magen gesteigert, was wiederum eine erhöhte Säuresekretion der Parietalzellen bewirkt (Moss *et al.*, 1992; Calam, 1999). Ebenso stimuliert *H. pylori* die Pepsinogensekretion der Hauptzellen. Als Folge der Infektion kommt es im infizierten Gewebe zu einer Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL1, IL8, IL18, TNF α und INF γ und zur Bildung von MCP-1, einem Chemoattraktanten für Monozyten. Dieses führt zur Infiltration der Magenmukosa mit Entzündungszellen wie Neutrophilen und Monozyten, die an ebenfalls in den Wirtszellen hochregulierte interzelluläre Bindemoleküle wie ICAM-1 binden können (Mori *et al.*, 2000).

Bei den meisten Infizierten bleibt eine Infektion mit *H. pylori* asymptomatisch, obwohl bei allen eine, allerdings unterschiedlich ausgeprägte, Entzündungsreaktion des Magenepithels nach der Infektion auftritt (Vaira *et al.*, 1994). In den meisten Fällen kann das angeborene Immunsystem das Bakterium nicht eliminieren, so dass sich aus einer anfänglichen akuten Gastritis eine aktive chronische Gastritis entwickelt, bei der sich zu Plasmazellen gereifte B-Zellen in Lymphfolikeln sammeln und anti-*H. pylori*-IgA-Antikörper produzieren. Solche Lymphfolikelbildung ist in den meisten *H. pylori*-infizierten Mägen zu finden und stellt eine Vorstufe zur Ausbildung des Mukosa-assoziierten Lymphgewebes dar, aus dem sich ein MALT-Lymphom entwickeln kann (siehe Abb. 1).

Etwa 10-20% aller *H. pylori*-Infizierten erleiden eine peptische Ulzeration (Moss und Calam, 1992), der in nahezu allen Fällen eine aktive chronische Gastritis vorausgegangen ist. Durch die Kombination aus erhöhter Säure- und Pepsinproduktion wird das Gewebe des Bulbus duodeni geschädigt. Die Regeneration erfolgt teilweise durch Magenepithelgewebe - eine Adaptationsreaktion, die gastrale Metaplasie genannt wird. Im Zuge dieses Gewebeumbaus kommt es zur Kolonisierung dieser Region mit *H. pylori*. Es folgt eine Erosion der Epithelzellen und die Ausbildung eines Ulkus duodeni. Eine Eradikation von *H. pylori* führt in 80% der Fälle zu einer Heilung des Ulkus duodeni, was eine enge Korrelation der Erkrankung mit der Infektion anzeigt.

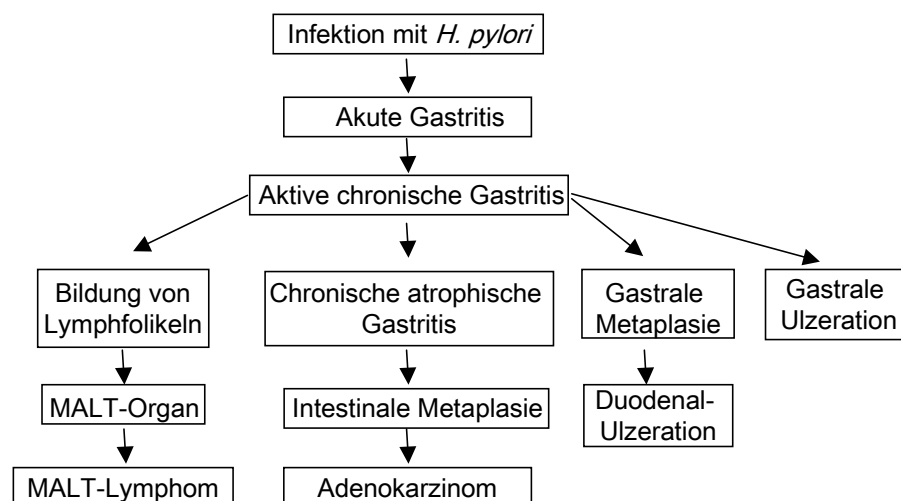


Abb. 1: Mögliche Wege der *H. pylori*-induzierten Pathogenese

Erklärungen im Text.

Als Folge der andauernden Inflammation kann sich aus der aktiven chronischen Gastritis eine atrophische Gastritis ausbilden, die durch den Verlust von Drüsengewebe gekennzeichnet ist. In diesem Fall kommt es durch die Schädigung der Parietalzellen zu einem Rückgang der Säureproduktion im Magen. Atrophische Gastritiden sind oftmals die Vorstufe zur intestinalen Metaplasie, bei der das Magenepithel durch intestinales Gewebe ersetzt wird. Sie kann bei 20% der symptomatischen Patienten endoskopisch diagnostiziert werden (Engstrand *et al.*, 1989).

Sowohl die atrophische Gastritis als auch die intestinale Metaplasie werden als präkanzeröse Läsionen angesehen, die oftmals mit der Entwicklung von Magenkrebs assoziiert sind (Erdman *et al.*, 1997). Dabei ist das Risiko eines mit *H. pylori*-Infizierten, an einem antralen Adenokarzinom zu erkranken, um das 6-fache erhöht (Logan, 1994; *Helicobacter* and Cancer Collaborative Group, 2001), weshalb die World Health Organisation (WHO)-Institution „International Agency for research on cancer“ (IARC) *H. pylori* 1994 als Klasse 1-Karzinogen, ein sogenanntes „sicheres Karzinogen“, eingestuft hat (IARC Working Group, 1994)

In einigen Studien wird die Vermutung geäußert, dass *H. pylori* mit der Entstehung nicht gastrischer oder sogar nicht-gastrointestinalen Krankheiten assoziiert ist. So zeigen serologische Studien einen Zusammenhang zwischen *H. pylori*-Infektion und entzündlichen Darmerkrankungen (Jovanovic *et al.*, 2001). Ebenfalls durch serologische Untersuchungen wurde die Infektion mit *H. pylori* mit Autoimmunlebererkrankungen und der Entstehung von Gallensteinen in Verbindung gebracht (Nilsson *et al.*, 2000). Umstritten ist der Zusammenhang von *H. pylori*-Infektionen und koronaren Herzkrankheiten. Die Daten zur Seroprävalenz liefern hier kein eindeutiges Bild. Während Kowalski *et al.* (2001) eine signifikante Korrelation demonstriert haben, zeigt eine andere Studie diese Verbindung zwischen *H. pylori*-Infektion und koronaren Herzkrankheiten nicht (Zhu *et al.*, 2002). Verbindungen wurden ebenfalls zu Dyspepsie, allergischen Hautkrankheiten, hepatischer Enzephalopathie und Anaemie in der Kindheit hergestellt (Vaira *et al.*, 2002)

1.2 Diagnose und Behandlung von *H. pylori*-Infektionen

Die zur Verfügung stehenden Tests zur Diagnose einer *H. pylori*-Infektion können in solche, die einen invasiven Eingriff durch Endoskopie erfordern und solche, die auf nicht-invasive Detektionsmethoden zurückgreifen, unterschieden werden. In den meisten Fällen wird der nicht-invasive C¹³-Atem-Test angewendet, bei dem den Patienten markierter Harnstoff verabreicht wird, der durch die Ureaseaktivität von *H. pylori* gespalten wird. Markiertes CO₂ lässt sich bei infizierten Personen schon nach wenigen Minuten in der Atemluft feststellen. Andere nicht-invasive Tests basieren auf dem immunologischen Nachweis von *H. pylori* im Stuhl durch mono- oder polyklonale Antikörper. Der Nachweis von anti-

Helicobacter-Antikörpern erfolgt in den meisten Fällen serologisch, ist aber auch in Speichelflüssigkeit und neuerdings auch im Urin der Patienten möglich.

Nach einer Biopsieentnahme kann der *H. pylori*-Nachweis histologisch oder durch Kultivierung auf Agarplatten erfolgen, was den Vorteil der möglichen Resistenzbestimmung hat. Schnellere Nachweismethoden sind der „Schnelle Urease Test“ (RUT), bei dem das Biopsiematerial in einer Testlösung mit pH-Indikator getaucht wird, und der Nachweis über PCR und „Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung“ (FISH), mit der neben dem Nachweis auch die Frage nach der Clarithromycinresistenz des Isolates in der Biopsie geklärt werden kann (Russmann *et al.*, 2001).

Die gängige Eradikation des Keims, die heute besonders bei einer diagnostizierten Ulkuserkrankung indiziert ist, erfolgt durch die einwöchige Gabe eines Säureinhibitors und einer Kombination aus zwei Antibiotika, entweder Amoxicillin und Metronidazol, oder Amoxicillin und Clarithromycin. Diese Behandlung eradiziert *H. pylori* in 80-90% der Fälle, allerdings nehmen die Resistenzen weltweit sprunghaft zu, insbesondere für Metronidazol, für das die Resistenzen in Europa zwischen 10 und 50% betragen. Die Resistenzen gegen Clarithromycin variieren zwischen 1 und 15% (Megraud, 1998) und sind der Hauptgrund für die meisten Therapieversagen (Graham, 1998). Diese Entwicklung macht die weitere Suche nach *Helicobacter*-Antibiotika dringend erforderlich.

1.3 Pathogenitäts- und Kolonisierungsfaktoren von *H. pylori*

H. pylori ist in der Lage, den Magen zu infizieren und über Jahre und Jahrzehnte im gleichen Wirt zu persistieren. Dabei ist das Bakterium im Magen einer Mikroumgebung aus Säure, schützender Mucinschicht der Epithelzellen und der Immunreaktion des Wirtes ausgesetzt. *H. pylori* ist mit einer Reihe von Faktoren ausgestattet, die das Überleben und die Persistenz des Bakteriums im Magen ermöglichen.

Als erster bakterieller Faktor, der essentiell für die Kolonisierung des Magens ist, wurde das Enzym Urease identifiziert. Das Ni^{2+} -abhängige Metalloenzym besteht aus den Untereinheiten UreA und B und spaltet Harnstoff, dessen Konzentration im menschlichen Magen 3-5 mM beträgt (Owen *et al.*, 1985), in Ammoniak und CO_2 . Da die Reaktionsprodukte in wässrigen Lösungen

im Gleichgewicht mit ihrer protonierten Form stehen, ist der Nettoeffekt dieser Reaktion ein Anstieg des pH-Wertes. Durch die Ureaseaktivität kann *H. pylori* mehrere Stunden die im Magenlumen vorkommenden pH-Werte von 1-2 überleben und dabei den zytoplasmatischen pH-Wert nahezu neutral halten (Rektorschek *et al.*, 1998; Stingl *et al.*, 2001). Ob Ammoniak dabei über die Zytoplasmamembran diffundiert, anschließend im Periplasma protoniert wird und damit den pH-Wert im Peri- und Zytoplasma neutral hält (Scott *et al.*, 1998), oder ob Ammoniak im Zytoplasma Protonen aufnimmt, wird kontrovers diskutiert (Stingl *et al.*, 2001). Die letzte Variante würde einen Ammoniumtransporter in der inneren Membran voraussetzen, der bisher nicht identifiziert werden konnte. Der Harnstoff wird, zumindest bei pH-Werten unter 5, durch Urel, einer pH-regulierten Permease in der inneren Membran, aufgenommen (Weeks *et al.*, 2000). Die Notwendigkeit für die Kolonisierung des Magens konnte sowohl für UreA und B (Eaton *et al.*, 1991) als auch für Urel (Skouloubris *et al.*, 1998) im Tiermodell gezeigt werden. Neben der Rolle bei der Säureprotektion scheint die Urease an MHC Klasse II-Moleküle der Magenepithelzellen zu binden und ihre Apoptose zu induzieren (Fan *et al.*, 2000). Außerdem ist sie an der Stimulation der Sekretion von IL6 und TNF α beteiligt (Tanahashi *et al.*, 2000).

Neben der Urease wirken noch andere Enzyme am Säureschutz mit. Eines dieser Enzyme ist RocF, eine Amidase, die Arginin in Ornithin und Harnstoff spaltet. Eine *H. pylori-rocF*-Mutante ist bei Abwesenheit von Harnstoff im Medium 1000-fach sensitiver gegen Säurestress (bei einer pH-Verschiebung von pH 7 auf pH 2,3 für 30min) als der Wildtyp und zeigt im Mausmodell eine Reduktion der Kolonisationsdichte im Magen um das Hundertfache (McGee *et al.*, 1999). Weitere harnstoffunabhängige Enzyme, die möglicherweise säureprotektiv wirken, sind die aliphatische Amidase AmiE (Skouloubris *et al.*, 1997) und eine Reihe von Aminosäure-Amidasen, die, wie die Urease ebenfalls Ammoniak produzieren und als Protonenpuffer fungieren können (Mendz und Hazell, 1995).

Die Säureprotektion sichert *H. pylori* aber nur wenige Stunden das Überleben im Magenlumen. Während im Lumen pH-Werte zwischen 1 und 2 gemessen werden, beträgt der pH-Wert an der Oberfläche der Magenepithelzellen 6-7. Um an die Apikalseite der Epithelzellen zu gelangen, ist *H. pylori* mit 2-7 unipolar angeordneten Flagellen ausgestattet, durch deren Rotation der Durchtritt durch den viskosen Mukus möglich ist. Die Flagellenfilamente, die zum Schutz vor

Säuredepolimerisation mit einer Hülle überzogen sind (Geis *et al.*, 1993), bestehen aus den Flagellinproteinen FlaA und FlaB, die beide für eine uneingeschränkte Motilität benötigt werden. Während aber *H. pylori-flaA*-Mutanten nicht flagelliert und nicht motil sind, werden bei *flaB*-Mutanten Flagellenfilamente ausgebildet. Die Mutante zeigt jedoch eine deutlich verringerte Motilität (Suerbaum *et al.*, 1993). Dabei bewegt sich *H. pylori* im Magen chemotaktisch entlang eines Harnstoff- und Bicarbonatgradienten aus dem Lumen in Richtung Epithel (Mizote *et al.*, 1997). Die Bedeutung sowohl der Motilität als auch der Chemotaxis bei der Etablierung einer *H. pylori*-Infektion wurde durch Versuche mit isogenen *flaA*- und *flaB*-Mutanten mit Infektionsversuchen in gnotobiotischen Ferkeln (Eaton *et al.*, 1996), *fliD*-Mutanten in Mäusen (Kim *et al.*, 1999) und *cheA*- bzw. *cheY*-Mutanten, die Proteine eines Zwei-Komponenten-Systems kodieren (Foyne *et al.*, 2000), ebenfalls im Mausmodell demonstriert. Keine der Mutanten ist in der Lage, im Magen zu persistieren, obwohl bei der Infektion mit *flaA*- und *flaB*- sowie *cheA*- und *cheY*-Mutanten signifikante anti-*H. pylori*-Antikörpertiter detektiert wurden. Das lässt darauf schließen, dass die Mutanten zumindest kurzzeitig im Wirt überleben können.

Die Fähigkeit, an die Magenepithelzellen zu adhären, stellt einen weiteren wichtigen Faktor des Bakteriums zur Persistenz im Magen dar, da es sonst durch die permanente Regeneration der Schleimschicht ins Magenlumen transportiert würde. Eine Reihe bakterieller Adhäsine oder adhärenzassoziierter Proteine konnten mittlerweile identifiziert werden: BabA2, AlpA, AlpB, HopZ und SabA gehören zu einer Gruppe von 32 äußeren Membranproteinen von *H. pylori*, die durch vergleichende Genomanalysen identifiziert wurden (Tomb *et al.*, 1997). Die eukaryontischen Bindepartner sind bislang weder für AlpA oder AlpB, deren Beteiligung an der Adhärenz an Kato III-Zellen und Magenbiopsieschnitten gezeigt wurde (Odenbreit *et al.*, 1999), noch für HopZ gefunden worden (Peck *et al.*, 1999). Dahingegen ist bekannt, dass BabA2 an das Blutgruppenantigen Lewis b (Ilver *et al.*, 1998) und SabA an Lewis x-Strukturen bindet (Mahdavi *et al.*, 2002). *Helicobacter* bindet außerdem über eine Komponente der Flagellenscheide, HpaA, an Sialinsäure und andere sialylierte Glykokonjugate (Evans *et al.*, 1988; Evans *et al.*, 1993), was wahrscheinlich der Grund für die reduzierte Adhärenz nicht flagellierter Mutanten an AGS-Zellen ist (Foyne *et al.*, 1999). Über das LPS bindet *H. pylori* an Lewis x-Antigenstrukturen (Osaki *et al.*, 1998) und Laminin

(Valkonen *et al.*, 1994). Zusätzlich wird die Bindung an eine Reihe sulfatierter und lipidierter Verbindungen *in vitro* beobachtet, ohne dass die bakteriellen Faktoren bekannt sind.

Tabelle 1: Bisher identifizierte *in vivo* essentielle Gene von *H. pylori*

Gene	Genprodukt	Tiermodell	Publikation
<i>ureA, ureB</i>	Urease, Untereinheit A und B	Gnotobiotische Ferkel	Eaton <i>et al.</i> , 1991
<i>flaA, flaB</i>	Flagellin A und B	Gnotobiotische Ferkel	Eaton <i>et al.</i> , 1996
<i>ureI</i>	Harnstoff-Permease	Maus	Skouloubris <i>et al.</i> , 1998
<i>fliD</i>	Haken-assoziiertes Protein 2	Maus	Kim <i>et al.</i> , 1999
<i>ggT</i>	γ -Glutamyltranspeptidase	Maus	Chevalier <i>et al.</i> , 1999
<i>pIdL</i>	Phospholipase A2	Maus	Dorrell <i>et al.</i> , 1999
<i>cheY, cheA</i>	Chemotaxis Zwei-Komponenten-System, Regulator, Sensor	Maus, Gnotobiotische Ferkel	Foyne <i>et al.</i> , 2000
<i>frdA</i>	Fumarat-Reduktase, Flavoprotein Untereinheit	Maus	Ge <i>et al.</i> , 2000

Neben seiner Rolle als Adhäsion spielt *H. pylori*-LPS bei der Evasion der Immunantwort eine Rolle. Viele Stämme besitzen in der O-spezifischen Seitenkette Blutgruppenantigenstrukturen wie Lewis x, Lewis y und auch eine Reihe weiterer Blutgruppenantigene, deren Ausstattung über Phasenvariation reguliert ist. Da diese Blutgruppenantigene auch auf der Oberfläche von Magenepithelzellen vorkommen, entkommt *H. pylori* möglicherweise der humoralen Immunantwort durch diesen Mechanismus, der auch als molekulares Mimikry bezeichnet wird (Appelmek *et al.*, 1997). *H. pylori-galE*-Mutanten, die ein stark verändertes LPS bilden, da keine Galaktosylgruppen an das N-Acetylglukosamin der O-Seitenketten synthetisiert wird, zeigen im Mausmodell einen attenuierten Phänotyp (Logan *et al.*, 2000).

Einen Abwehrmechanismus gegen das angeborene Immunsystem bilden die Superoxiddismutase, deren enzymatische Reaktion gegen die beim „oxidative burst“ freigesetzten Sauerstoffradikale der polymorphkernigen Leukozyten und Makrophagen schützt (Spiegelhalder *et al.*, 1993), sowie die Katalase, die von Phagozyten produziertes Wasserstoffperoxid detoxifiziert (Hazell *et al.*, 1991). Diese Abwehr stellt einen wichtigen Schutz dar, denn durch das Neutrophile-aktivierende Protein NapA, das alle *H. pylori*-Stämme produzieren, werden

Neutrophile in der Magenmukosa am Ort der Kolonisierung rekrutiert und aktiviert, was zu einer Schädigung der Magenmukosa führt (Evans *et al.*, 1995). Das vakuolisierende Zytotoxin VacA ist ebenfalls maßgeblich an der Schädigung des infizierten Magengewebes beteiligt. Das *vacA*-Gen kommt in allen *H. pylori*-Stämmen vor und kodiert ein ca. 140 kDa Präprotein, das zur Familie der Autotransporter-Proteine gehört. Bei der Sekretion wird sowohl die N-terminale Signalsequenz als auch ein C-terminales Fragment, das beim Transport durch die äußere Membran eine β -Fass-Struktur bildet, abgespalten. Dadurch entsteht das reife ca. 88 kDa Toxin, das z.T. in den Überstand sezerniert, z.T. mit der äußeren Membran assoziiert bleibt. Das Toxin wird nochmal in ein N-terminales 37kDa (p37) und ein C-terminales 58kDa schweres Fragment (p58) gespalten, die aber nicht-kovalent verbunden bleiben.

VacA führt nach der Internalisierung durch clathrin-unabhängige Endozytose zu einer Vakuolisierung zellulärer Kompartimente, die ein Hybrid aus Lysosomen und späten Endosomen darstellen (Sommi *et al.*, 1998). VacA bildet in der Vakuolenmembran möglicherweise einen Anionen-selektiven Kanal (Szabo *et al.*, 1999). Durch die Erhöhung der Anionendurchlässigkeit wird die vakuoläre ATPase (V-ATPase) aktiviert, was zu einer Azidifizierung der Vakuolen führt. Dadurch wird Ammoniak im Lumen protoniert und Ammoniumionen reichern sich an, was den osmotischen Einstrom von H₂O und ein Anschwellen des Kompartiments zur Folge hat.

Neben dieser makroskopisch zu verfolgenden Aktivität der Vakuolisierung sind eine Reihe weiterer zellulärer Effekte auf VacA zurückgeführt worden: Apoptoseinduktion in Magenepithelzellen (Peek *et al.*, 1999), Umlagerung von Aktinfilamenten (Ashorn *et al.*, 2000), reduzierte Mucin Sekretion der Magen­zellen (Beil *et al.*, 2000), Stimmulierung der Pepsinogenproduktion in AGS-Zellen (Chan *et al.*, 1996) und Abnahme der Säuresekretion in isolierten Parietalzellen (Kobayashi *et al.*, 1996). Als mögliche zelluläre Bindepartner sind RACK1 (Hennig *et al.*, 2001) und ein vimentinbindendes Protein, VIP54, ausgemacht worden (de Bernard *et al.*, 2000). Dabei ist die physiologische Relevanz für viele dieser Effekte noch zu prüfen.

Bei einer Einzelinfektion mit *vacA*-Mutanten zeigt sich im Mausmodell die gleiche Reisolierungsrate wie beim Wildtyp, bei Mischung von Mutante und Wildtyp im Verhältnis 10:1 ist nach der Infektion allerdings nur der Wildtyp zu

reisolieren, was für eine deutliche Attenuierung der *vacA*-Mutante spricht (Salama *et al.*, 2001).

Ein entscheidender bakterieller Faktor in der Pathogenese, der epidemiologisch streng mit der Entstehung von Magengeschwüren und Magenkrebs assoziiert ist, ist das Vorhandensein der *cag*-(Cytotoxin-assoziiertes Gen) Pathogenitätsinsel (PAI), eines ca. 37 kBp großen DNA-Abschnitts, der einen geringeren GC-Gehalt als das restliche Genom aufweist und von identischen Sequenzwiederholungen von 31Bp flankiert wird. Einige der 27 Gene darauf kodieren für strukturelle Komponenten eines Typ IV-Sekretionssystems Gram-negativer Bakterien. Es konnte gezeigt werden, dass über dieses Sekretionssystem das ca. 120-140 kDa schwere CagA-Protein in Magenepithelzellen transloziert (Odenbreit *et al.*, 2000; Stein *et al.*, 2000; Asahi *et al.*, 2000) und dort von einer Src-ähnlichen Tyrosinkinase phosphoryliert wird (Selbach *et al.*, 2002). Phosphoryliertes CagA bindet an eine SHP-2-Phosphatase, was zu einer Aktivierung der Phosphataseaktivität und einer Deregulierung zellulärer Funktionen führt (Higashi *et al.*, 2002). CagA wird nicht nur in Magenepithelzellen transloziert, sondern auch in humane Granulozyten und Makrophagen, in denen das tyrosinphosphorylierte Protein spezifisch in ein phosphoryliertes C-terminales 35-45 kDa Fragment und ein nicht-phosphoryliertes N-terminales Fragment von ca. 90 kDa gespalten wird (Odenbreit *et al.*, 2001; Ramarao and Meyer, 2001).

Der genaue Effekt von CagA auf die zellulären Funktionen ist indes nicht bekannt. Allerdings führt die Phosphorylierung von CagA zu einer Dephosphorylierung von Wirtszellproteinen mit einer molekularen Masse von 120-130 kDa und 80 kDa (Odenbreit *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung von transloziertem CagA ist zudem notwendig, aber nicht ausreichend für die Induktion des „hummingbird“-Phänotyps, einer Aktinumlagerung der infizierten Zellen, die zur Bildung von Zellauswüchsen *in vitro* führt (Backert *et al.*, 2001). Die Bindung von Typl-Stämmen (*cag*⁺) an Magenepithelzellen induziert die Produktion und Sekretion einer Reihe von Zytokinen wie IL8, ENA-78 (Rieder *et al.*, 2001), GM-CSF und TNF α (Foryst-Ludwig und Naumann, 2000). Die Induktion des präinflammatorischen Zytokins IL8 ist dabei unabhängig von der *cagA*-Expression (Censini *et al.*, 1996), aber abhängig vom Vorhandensein eines intakten Typ IV-Translokationsapparats (Fischer *et al.*, 2001).

1.4 Tiermodelle zur Untersuchung der *H. pylori*-Infektion

Eine Voraussetzung für die Untersuchung der Auswirkungen bakterieller Faktoren während der Infektion sowie der darauf folgenden Wirtsantwort ist das Vorhandensein geeigneter Tiermodelle. Als natürliche Wirte einer *H. pylori*-Infektion sind Menschen, Rhesusaffen und Katzen bekannt, wobei die Durchseuchungsrate bei Letzteren sehr niedrig ist.

Erste Versuche, ein *H. pylori*-Infektionsmodell in Labortieren wie Mäusen, Ratten oder Kaninchen zu etablieren, waren nicht erfolgreich (Cantorna und Balish, 1990). Auch immunsupprimierte Mäuse konnten nur temporär infiziert werden (Karita *et al.*, 1991). Daraufhin wurden zum einen Modelle mit verwandten *Helicobacter*-Arten entwickelt, wie das *Helicobacter felis*-Modell in Mäusen und Ratten (Lee *et al.*, 1990) oder das *Helicobacter mustelae*-Modell in Frettchen (Fox *et al.*, 1990) und „nicht-humanen Primaten“ (Dubois *et al.*, 1994). Zum anderen wurde die Suche nach Tieren erweitert, die empfänglich für eine Infektion mit *H. pylori* sind, wie gnotobiotische Ferkel (Krakowka *et al.*, 1987) und Hunde (Radin *et al.*, 1990). Erste Berichte einer erfolgreichen *H. pylori*-Infektion in immunkompetenten Mäusen stammen von Marchetti *et al.* (1995), die frische, unpassagierte klinische Isolate verwendet haben. Auch Langzeitexperimente mit einer hohen bakteriellen Dichte sind im Mausmodell mittlerweile etabliert (Lee *et al.*, 1997). Alternative Modelle sind in Meerschweinchen (Shomer *et al.*, 1998), Makakenaffen (Dubois *et al.*, 1996) und mongolischen Wüstenrennmäusen (Yokota *et al.*, 1991; Matsumoto *et al.*, 1997) entwickelt worden.

Ziel eines *H. pylori*-Tiermodells ist es, den Verlauf der Infektion und die Pathologie der Infektion beim Menschen so genau wie möglich zu simulieren. Dabei ist die chronisch aktive Gastritis, die durch einen hohen Grad der Entzündung des betroffenen Gewebes und durch die Einwanderung von Neutrophilen in die Magenmukosa gekennzeichnet ist, ein Vorläufer schwerwiegenderer Krankheitsbilder der Gastralregion beim Menschen. Im Mausmodell wurde die Aktivierung von Neutrophilen nur selten beobachtet. Die schwere Gastritis, die bei der Infektion der Maus mit *H. felis* beobachtet wird, ist ebenso wie die milde Inflammation bei der Mausinfektion mit dem mausadaptierten *H. pylori* SS1-Stamm auf die nur schwach besiedelte Corpusregion beschränkt, während im menschlichen Magen die Gastritis im

Antrum und nur seltener im Corpus zu finden ist (Lee, O'Rourke *et al.*, 1997). Gleiches gilt für fast alle anderen Tiermodelle, wobei Meerschweinchen und mongolische Wüstenrennmäuse, die beide eine schwere aktive und chronische Gastritis im Corpus und der Antralregion des Magens bilden, eine Ausnahme darstellen (Shomer *et al.*, 1998; Ikeno *et al.*, 1999).

Die Infektion mit *H. pylori* führt beim Menschen in 10-20% der Fälle zur Entwicklung von Magen- und Duodenalulzera. Während bisher in noch keinem Modell die Entstehung von Duodenalulzera beobachtet werden konnte, berichteten Erdman *et al.* (1997) über eine *Helicobacter*-induzierte Entstehung von Magenulzera im Frettchen-*H. mustelae*-Modell. Auch mongolische Wüstenrennmäuse entwickeln nach Infektion mit *H. pylori* Magenulzera. Von 25 infizierten Tieren fanden sich nach 26 Wochen 5 mit Magenulzera (Ikeno *et al.*, 1999). Matsumoto *et al.* (1997) diagnostizierten bereits 16 Wochen nach der Infektion mit *H. pylori* die Entstehung von Geschwüren in der Antralregion einiger Wüstenrennmaus-Mägen. Wüstenrennmäuse, die nach der Infektion mit Amoxicillin behandelt wurden, zeigten keine Bildung von Magenulzera.

Epidemiologische Studien belegen den Zusammenhang zwischen *H. pylori*-Infektion und der Entstehung eines Magenadenokarzinoms. Auch hier konnte das Wüstenrennmaus-Modell die Evidenz erbringen, dass die Infektion mit *H. pylori* allein die Bildung von Magenkrebs induzieren kann. 62 Wochen nach der Infektion entwickelten 37% der 27 untersuchten Tiere ein Adenokarzinom, was bei keinem Tier der uninfizierten Kontrollgruppe auftrat. Die Tumore waren invasiv und mit metaplastischem Epithelgewebe assoziiert, was auf einen der Situation beim Menschen vergleichbaren Kanzerogeneseprozess schließen lässt (Watanabe *et al.*, 1998). Die Entstehung der Magenadenokarzinome in der Wüstenrennmaus konnte mittlerweile mit der Infektion mit einem Cag-PAI-positiven *H. pylori*-Stamm korreliert werden (Ogura *et al.*, 2000), was epidemiologische Studien untermauert, nach denen 56% aller Patienten mit Magenadenokarzinom mit einem CagA-positiven *H. pylori*-Stamm infiziert sind (Rokkas *et al.*, 1999). In einem Vergleich der pathologischen Veränderungen des Magens zwischen mit *H. pylori*-infizierten Menschen und Wüstenrennmäusen wurde histologisch in beiden Gruppen chronisch aktive Gastritis, intestinale Metaplasie und die Entstehung von Lymphfollikeln festgestellt (Sawada *et al.*, 1999). Unterschiede ergaben sich bei der Untersuchung der Infiltration mit polymorphkernigen Granulozyten und

Neutrophilen, die sich beim Menschen auf die Mukosa beschränkte, bei den Wüstenrennmäusen jedoch tiefer bis in die Subserosa reichte. Trotz der Unterschiede, die auch den zeitlichen Verlauf der histologischen Veränderungen betreffen, stellten die Autoren fest, dass das Wüstenrennmausmodell als einziges die bekannten *H. pylori*-induzierten histologischen Veränderungen beim Menschen widerspiegelt.

Während dieses Modell offensichtlich geeignet ist, die Pathogenese und die Beteiligung bakterieller Faktoren daran zu untersuchen, betreffen die Limitierungen des Modells hauptsächlich die Untersuchungen der Wirtsfaktoren bei der Infektion. So ist im Gegensatz zur Maus oder zum Affen nur sehr wenig über die Immunologie des Tieres bekannt, was das Modell für Vakzinierungsstudien ungeeignet macht. Ebenso wenig stehen „knockout“-Mutanten zur Verfügung, mit denen die Beteiligung von Wirtsfaktoren am Infektionsprozess genauer beleuchtet werden könnten. Für diese Fragestellungen ist das Mausmodell die erste Wahl, wenn auch die Pathogenese deutliche Unterschiede zum Menschen aufweist.

Obwohl alle angesprochenen Tiermodelle in ihrer Aussage für die *H. pylori*-Infektion beim Menschen beschränkt sind, spielten und spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Klärung verschiedenster offener Fragen. So konnten pathologische Veränderungen des Magens mit der *H. pylori*-Infektion korreliert werden. Auch wurden eine Reihe bakterieller Faktoren, die eine Rolle im Infektionsprozess spielen, wie die Urease und die Motilität des Organismus, in verschiedenen Modellen identifiziert. Viele Studien haben zeigen können, dass eine Immunisierung möglich ist, und Versuche mit „knockout“-Mäusen konnten die daran beteiligten Mechanismen aufdecken.

1.5 Die Erforschung *in vivo* essentieller und infektionsrelevanter Gene

Pathogene Bakterien haben im Laufe der langen Evolution eine Reihe von Mechanismen entwickelt, um im Wirtsorganismus zu überleben und Veränderungen in der Mikroumgebung während des Pathogeneseprozesses zu messen und darauf zu reagieren (Finlay und Falkow, 1989). Um diese infektionsrelevanten Faktoren zu identifizieren, sind eine Reihe von genetischen Ansätzen und Methoden entwickelt worden, um Pathogenitätsstudien *in vivo* betreiben zu können (Smith, 1998).

Dabei bieten die Sequenzierungsprojekte ganzer bakterieller Genome neue Ansätze zur systematischen Identifikation bakterieller Virulenzdeterminanten. Der ersten kompletten Genomsequenz des Meningitis-Erregers *Haemophilus influenzae* 1995 (Fleischmann *et al.*, 1995) sind bis heute 39 weitere Sequenzen humanpathogener Bakterien gefolgt (Stand Juli 2002), darunter auch die des *H. pylori*-Stammes 26695, isoliert aus einem Patienten mit Gastritis (Tomb *et al.*, 1997), und die des Stammes J99 aus einem Patienten mit Duodenalulkus (Alm *et al.*, 1999).

Durch Methoden der vergleichenden Bioinformatik konnten aus den Genomsequenzen viele Gene identifiziert werden, deren Produkte Homologien zu bereits bekannten Virulenzdeterminanten anderer Bakterien aufweisen. Dennoch weisen ca. 40% der bei der Sequenzierung identifizierten offenen Leserahmen lediglich entweder Homologien zu offenen Leserahmen anderer Organismen auf, deren biologische Funktion nicht geklärt ist, oder besitzen keine Homologie zu bisher bekannten Sequenzen (Alm *et al.*, 1999). Die Menge an Information machte die Entwicklung von funktionellen Genomanalysen *in vivo* notwendig. Diese Ansätze können in solche unterschieden werden, die Gene identifizieren, die spezifisch im Wirt hochreguliert werden, und solche, durch die Gene identifiziert werden können, die für das Überleben und die Persistenz *in vivo* unabdingbar sind. Dem erstgenannten Ansatz liegt die Überlegung zugrunde, dass Bakterien nur dann ein Gen exprimieren, wenn die Expression dem Überleben dient. Dieser Idee wird mit den Methoden der „*in vivo* expression technology“ (IVET) und der

„differential fluorescence induction“ (DFI) nachgegangen (Valdivia und Falkow, 1997).

Bei der IVET-Methode werden Fragmente der chromosomalen DNA des zu untersuchenden Pathogens vor ein promotorloses Hybridoperon aus dem Purinbiosynthese-Gen *purA* und den Reportergenen *lacZ* und *lacY* fusioniert. Diese Fusionen werden über homologe Rekombination in einen *purA*-negativen Stamm eingebracht. Mit einer Mischung dieser Stämme werden Versuchstiere infiziert. Da Purine im Versuchstier nicht frei verfügbar sind, überleben nur die Bakterien, bei denen sich vor dem *purA*-Gen ein unter *in vivo*-Bedingungen aktiver Promotor befindet. Die Bakterien werden aus dem infizierten Gewebe des Tieres isoliert und auf Agar ausplattiert. Solche Klone, die *in vitro* keine oder nur eine geringe *lacZ*-Aktivität besitzen, der Promotor also nur *in vivo*, nicht *in vitro* aktiv ist, werden zur Sequenzierung des integrierten chromosomalen Fragments herangezogen. Die Originalanwendung an *Salmonella typhimurium* in BALB/C Mäusen (Mahan *et al.*, 1993), sowie eine ähnliche IVET-Anwendung an *Pseudomonas aeruginosa* in neutropenischen Mäusen (Wang *et al.*, 1996) identifizierte eine Reihe von differentiell exprimierten Genen, die in vier Klassen einzuteilen sind: 1. regulatorische Funktionen, 2. metabolische, physiologische Funktionen, 3. Stressantwort, 4. unbekannte Gene. In weiteren Anwendungen wurde die IVET-Methode durch den Einsatz anderer Reportergene für eine Reihe weiterer pro- und haploider eukaryontischen Pathogenen nutzbar gemacht.

Die DFI-Methode basiert auf einer ähnlichen Idee wie die IVET, allerdings erfolgt hier die transkriptionelle Kopplung mit einem promotorlosen *gfp*-Gen (green fluorescent protein) aus der Qualle *Aequoria victoria*, dessen Genprodukt grün fluoresziert, wenn es mit blauem Licht angeregt wird. Da dazu keine Substratzugabe notwendig ist, ermöglicht die DFI-Technologie das Verfolgen der Expression bakterieller Gene in lebenden Wirtszellen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass eine Isolierung der durch GFP leuchtenden Bakterien und deren Wirtszellen, mit denen sie assoziiert sind, automatisiert mittels FACS (fluorescence-assisted cell sorting) erfolgen kann. Mit dieser Technik wurden differentiell exprimierte Gene von *S. typhimurium* (Valdivia und Falkow, 1997), *S. pneumoniae* (Bartilson *et al.*, 2001) und *Staphylococcus aureus* (Schneider *et al.*, 2002) identifiziert.

Während diese Methoden Gene identifizieren, deren Expression *in vivo* hochreguliert wird, zielt die Methode der „signature tagged mutagenesis“ (STM) auf die Identifikation *in vivo* essentieller Gene ab. Dabei wird durch Transposon-Mutagenese die DNA der Mutanten mit einer individuellen molekularen Signaturmarke versehen. Durch diese spezifische Signatur lassen sich Gruppen von unterschiedlich markierten Mutanten auf ihre Fähigkeit zum Überleben und zur Persistenz im Wirtsorganismus testen. Welche der Mutanten nicht in der Lage waren, den Wirt zu infizieren, kann durch den Vergleich der molekularen Signaturen in der Infektionsgruppe mit denen in der Gruppe von Bakterien, die sich aus dem Versuchstier reisolieren ließen, mittels negativer Selektion bestimmt werden. In der Erstanwendung bestanden die Signaturen aus semizufällig generierten 40Bp langen DNA-Sequenzen mit der Abfolge 20 x N (A, T, G, oder C) K (G oder C), die von zwei konstanten Regionen flankiert wurden (Hensel *et al.*, 1995). Die Detektion und der Vergleich der Signaturen erfolgte über ein Kolonie-Blot-Verfahren, bei dem die in einer Maus getesteten 96 unterschiedlichen *S. typhimurium*-Mutanten geordnet auf eine Membran aufgebracht wurden. Als Hybridisierungssonde diente die Gesamtheit der sich im Eingangs- bzw. Ausgangsgemisch befindlichen Signaturen, die über PCR amplifiziert und radioaktiv markiert wurden. Mutanten, die auch nach der Passage aus dem Versuchstier reisoliert werden konnten, zeigten positive Signale im Kolonie-Blot, während bei denen, die nicht reisoliert werden konnten, das Signal fehlte. Diese Mutanten können anschließend charakterisiert und deren Transposoninsertionsstelle bestimmt werden (siehe Abb. 2).

Mittlerweile ist die STM-Methode bei einer Reihe von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien sowie dem opportunistisch humanpathogenen Pilz *Candida glabrata* erfolgreich angewendet worden (Mecsas, 2002). In diesen STM-Applikationen wurden einige methodische Veränderungen vorgenommen, die eine Anwendbarkeit auf andere Pathogene und eine verlässliche Signatur-Detektion gewährleisten.

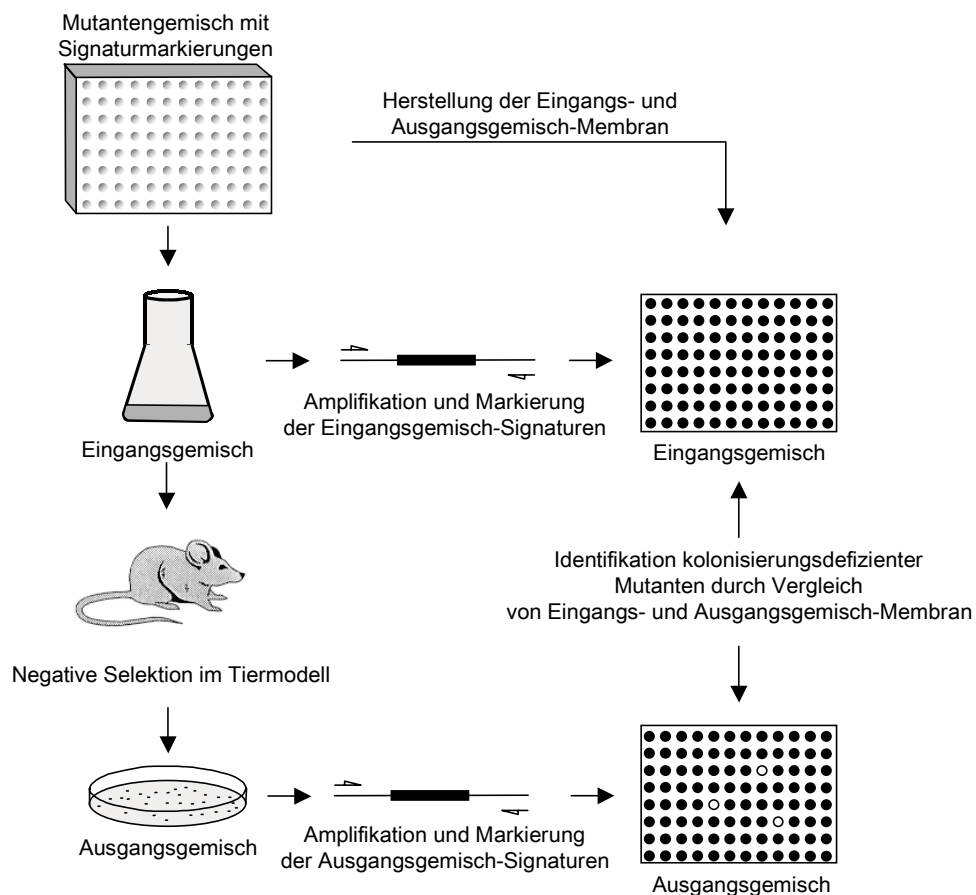


Abb. 2: Prinzip der STM-Methode

Eine Bank individuell signaturmarkierter Mutanten wird in einer 96-Napfschale archiviert. Ausgehend von diesen Schalen werden zwei Hybridisierungsmembranen hergestellt (Plasmide, PCR-Produkte, Kolonie-Blots). Die Mutanten werden gemischt und für die Infektion in einem geeigneten Tiermodell eingesetzt. Nach der Reisolierung werden die Mutanten vereinigt. Die chromosomale DNA des Inokulumgemisches und des Mutantengemisches nach der Reisolierung wird als Matrize in einer PCR-Reaktion zur Amplifikation der Signaturen eingesetzt. Die amplifizierten Signaturen werden als Sonde für die zuvor hergestellten Hybridisierungsmembranen verwendet. Mutanten, die nicht reisoliert wurden, werden dadurch identifiziert, dass sie auf der Membran des Inokulums, nicht aber auf der Membran der reisolierten Mutanten ein DNA-Hybridisierungssignal aufweisen.

Die *in vivo*-Transpositionsinduktion der Originalanwendung wurde in einigen Ansätzen durch die Verwendung von *in vitro*-Transposons ersetzt, was die Anwendung auch für solche Bakteriengruppen möglich macht, für die keine *in vivo*-Transpositionsinduktion etabliert ist. Wurden in der Originalanwendung semizufällig generierte Signaturen verwendet, deren Sequenz nicht bekannt war, wurden später die verwendeten Signaturen anhand ihrer Hybridisierungseigenschaften und ihrer Amplifizierbarkeit ausgewählt. Zudem

wurden die Signaturen sequenziert, wodurch es möglich war, zur Sequenzdetektion ein sensitiveres Dot-Blot-Verfahren anstelle der Koloniehybridisierung einzusetzen. Die unterschiedliche Besiedelungsdichte des jeweils infizierten Gewebes und die Anzahl an verschiedenen tolerierten Mutanten führte dazu, dass die Komplexität des Mutantengemischs an die Erfordernisse des verwendeten Infektionsmodells angepasst wurde, was in den meisten Fällen zu einer Reduzierung der ursprünglich im *Salmonella*-Maus-Modell eingesetzten 96 Mutanten geführt hat. So reicht die Gruppengröße in den verschiedenen Modellen von 11 (Coulter *et al.*, 1998) bei *S. aureus* in verschiedenen Infektionsmodellen bis 96 in einem *Legionella pneumophila*-Modell in Schweinen (Edelstein *et al.*, 1999).

Bei allen Anwendungen wurden Gene identifiziert, deren Genprodukte schon zuvor als Virulenzdeterminanten bekannt waren und so die Selektionsmodelle validierten. Eine Reihe von Genen wurden, obwohl die Genprodukte bereits biochemisch charakterisiert waren, erst nach der STM-Analyse als virulenzassoziiert erkannt. Hierzu zählen beispielsweise die Gene *pta* und *ptfA*, die an der Synthese und Degradation von Acetylphosphat bei *V. cholerae* beteiligt sind und eine Rolle bei der Regulation des *toxR*-Regulons spielen (Chiang und Mekalanos, 1998). Neben einer Gruppe von Proteinen, deren Funktionen durch Sequenzhomologien zu bekannten Proteinen wahrscheinlich ist, sind in diesen Suchen Proteine als essentiell für die Kolonisierung identifiziert worden, die keine Homologien zu bisher bekannten Proteinen aufweisen.

Obwohl die STM-Methode für viele pathogene Bakterien einen neuen Einblick in die molekularen Mechanismen der Kolonisierung und Persistenz im Wirtsorganismus gegeben hat, unterliegt auch diese Methode einigen Limitierungen. So wurden bisher in keiner STM-Suche translozierte bakterielle Toxine oder Effektormoleküle gefunden, was darauf zurückzuführen ist, dass durch Toxine hervorgerufene Veränderungen des Wirtsgewebes oder der Immunantwort auch den Toxingen-defizienten Mutanten in der Infektionsgruppe ein Überleben im Wirtsorganismus ermöglicht. Solche Transkomplementationeffekte sind auch für sekretierte bakterielle Faktoren denkbar. Ferner lassen sich bei der Verwendung von Transposons zur Mutantengenerierung polare Effekte auf die Expression nachfolgender Gene nicht ausschließen, so dass die Essentialität *in vivo* nicht spezifisch einem Genprodukt zugewiesen werden kann.

Ungeachtet dieser Limitierungen bietet die STM-Technologie die Möglichkeit, eine genomumfassende Suche nach Kolonisierungsfaktoren eines Pathogens mit einem minimalen Einsatz von Versuchstieren durchzuführen.

1.6 Ziele dieser Arbeit

H. pylori kolonisiert den Magen von etwa 50% der Weltbevölkerung, und die Infektion ist mit der Entstehung schwerer gastroduodenaler Krankheiten einschließlich chronischer Gastritis, Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren, MALT-Lymphom und Adenokarzinom korreliert. Bisher sind nur wenige bakterielle Faktoren bekannt, die dem Bakterium die Kolonisierung und Persistenz über Jahrzehnte ermöglicht, wie die Urease und das Flagellensystem.

Die sequenzierten Genome von *H. pylori* 26695 und J99 enthalten 1552 bzw. 1495 offene Leserahmen, von deren Genprodukten etwa ein Drittel nur schwache Homologien zu bekannten Proteinen besitzen oder deren Funktion gänzlich unbekannt ist. Ein Großteil der weiteren Gene kodiert für Proteine, die an zentralen Stoffwechselwegen beteiligt und damit essentiell für das Überleben *in vitro* sind und keine Virulenzfaktoren *per se* darstellen. Unter den Verbleibenden sind viele, deren Rolle im Infektionsprozess noch unbekannt ist.

Ziel dieser Arbeit war die Analyse von Genen, deren Produkte nicht *in vitro*, aber *in vivo* essentiell für das Überleben von *H. pylori* im Magen des Wirtes sind. Die Methode der STM bot dabei die Möglichkeit, viele Mutanten parallel auf ihre Kolonisierungsfähigkeit zu überprüfen. Dazu sollte eine repräsentative Genbank erstellt werden, die effizient und genomumfassend mutagenisiert und mit molekularen Signaturen versehen werden musste. Für die Suche war die Etablierung eines geeigneten Tiermodells erforderlich, bei dem sich eine multiple Infektion mit verschiedenen *H. pylori*-Mutanten stabil etablieren ließ. Sowohl die Infektion als auch die Parameter zur Detektion und zum Vergleich der Signaturen dieser für *Salmonella* etablierten Methode mussten an die spezifischen Anforderungen von *H. pylori* angepasst werden.

Die Identifikation neuer *in vivo* essentieller Gene sollte zu einem vollständigeren Bild der an der Infektion beteiligten bakteriellen Faktoren führen und einen Ansatz zur Identifikation *H. pylori*-spezifischer Virulenzmechanismen

liefern. Zum anderen bildet die Identifikation infektionsrelevanter Gene die Grundlage zur Entwicklung neuer, *H. pylori*-spezifischer Antiinfektiva.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

2.1.1 Bakterienstämme

2.1.1.1 *Helicobacter pylori*-Stämme

Soweit nicht anders angegeben, wurden die *H. pylori*-Stämme im Rahmen dieser Arbeit hergestellt.

Tabelle 2: Verwendete *H. pylori*-Stämme

Stamm	Beschreibung
G1.1	Klinisches Isolat eines Patienten mit Duodenalulkus CPY3401 (Karita <i>et al.</i> , 1991) nach Adaptation an Wüstenrennmäuse Umbenennung in G1.1 (Wirth <i>et al.</i> , 1998)
Q1.1	G1.1, transformiert mit Suizidplasmid pEG 21, Strep ^R
Q1RI	Q1.1 Reisolat nach einmaliger Passage im Wüstenrennmausmagen
Q1RII	Q1.1 Reisolat nach zweimaliger Passage im Wüstenrennmausmagen
Q1RIII	Q1.1 Reisolat nach dreimaliger Passage im Wüstenrennmausmagen
J99	Klinisches Isolat eines Patienten mit Duodenalulkus, komplett sequenziert (Alm <i>et al.</i> , 1999)
ATCC 26695	Klinisches Isolat eines Gastritispatienten, komplett sequenziert (Tomb <i>et al.</i> , 1997)
P1	Klinisches Isolat 69A der Abteilung Med. Mikrobiologie der Universität Amsterdam (Haas <i>et al.</i> , 1993)
Q1RIII-TnHK9-Mutanten	Q1RIII::TnHK9 _(TAG3-64)

2.1.1.2 *Escherichia coli*-Stämme

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Beschreibung
DH5 α	F ⁻ , ϕ 80/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>r</i> _K ⁻ , <i>m</i> _K ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , λ ⁻ , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> (Gibco BLR)
TOP10	F ⁻ , ϕ 80/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Strep ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> (Invitrogen)

BL 21	F^- , <i>ompT</i> , <i>hsdS_b</i> , (r_B^- , m_B^+), <i>gal</i> , <i>dcm</i>
HB101	F^- , <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>leuB</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> (Strep ^R), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>supE-44</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsd-S 20</i> (r_B^- , m_B^-)

2.1.2 Plasmide

Tabelle 4: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pCR2.1-TOPO	<i>ori_{ColE1}</i> , <i>ori_{t1}</i> , <i>lacZ</i> , Amp ^R , Kan ^R (Invitrogen)
pBA	<i>ori_{ColE1}</i> , Tet ^R , Amp ^R (Halter <i>et al.</i> , 1984))
pMOD	<i>ori_{ColE1}</i> , Amp ^R , 19Bp invertierte Wiederholungssequenzen, Konstruktionsvektor für EZ::TN-Transposons (Epicentre)
pGEX4T3	<i>ori_{ColE1}</i> , Amp ^R , (Amersham Pharmacia Biotech)
pSO50	pMin1 Derivat, <i>tet</i> , <i>mob</i>
pHK9 _(TAG3-64)	pMOD mit <i>cat</i> _{TAG 3-64}
pMU140a	(Odenbreit <i>et al.</i> , 1999)
pWS30	(Schmitt und Haas, 1994)
pPFR1-CAT	(Bereswill <i>et al.</i> , 1998)
pDHO35	$\Delta comB$ (<i>cat</i>):pMin1, <i>orf1</i> , <i>cat</i> , <i>orf3</i> , Tet ^R , Cam ^R
pDH29	pBSII KS+, <i>recA::ermC</i> , Amp ^R , Erm ^R (Schmitt <i>et al.</i> , 1995)
pGst-PrtC	pGex4T3 mit <i>gst-prtC</i> -Fusion
pTnMax5	(Haas <i>et al.</i> , 1993)

2.1.3 Oligonukleotide

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide

Name	Funktion	Sequenz 5'-3'
TAG 3	Signatur-Detektion	CAAACGCACTGAAATCTTTA
TAG 4	Signatur-Detektion	TAAACTGTAGTCTAGGTCTC
TAG 7	Signatur-Detektion	TTTGGCAACCGGGTTGTTGC
TAG 11	Signatur-Detektion	AATTCAATTCTCGTGTTTCC
TAG 13	Signatur-Detektion	CTTCCAGGAACCCGGGCTGG
TAG 16	Signatur-Detektion	TTAGGGTGTTATGCCTGCGG
TAG 17	Signatur-Detektion	GTCATCCCCCTTGCTCACCC
TAG 20	Signatur-Detektion	AAATCTTGTAATCAACTCTAG
TAG 21	Signatur-Detektion	TATTTGGGTCATCTTCGTGG
TAG 22	Signatur-Detektion	CTTCGCGGGCTAGTAGTATG
TAG 26	Signatur-Detektion	AGCTTGGAGGGCTTGGCGCC
TAG 27	Signatur-Detektion	CAATACCGTTGCGGATGAAT

TAG 28	Signatur-Detektion	AGAAGTTTCAGCGGTCAGTA
TAG 30	Signatur-Detektion	ACCGATACATGATACGATGT
TAG 31	Signatur-Detektion	GCCATTGGACTTGAGCTCTG
TAG 41	Signatur-Detektion	CTGTATCATACTGTTTCCC
TAG 44	Signatur-Detektion	TGTTTCATGATTTGGTGAGAG
TAG 45	Signatur-Detektion	GAGAATGATTATTAGACTGA
TAG 47	Signatur-Detektion	GCTCACGACGGGCACTGTAC
TAG 48	Signatur-Detektion	ATAGTGATAGTCCATTTTATAG
TAG 54	Signatur-Detektion	ATTTTCCGTGGATTTGTGT
TAG 62	Signatur-Detektion	AGTTTTAGTAACGAGTTAGTAG
TAG 63	Signatur-Detektion	AGTTCACAGGTAACCGGCTTG
TAG 64	Signatur-Detektion	GGTTTACTTAGCGATTGATT
pMOD FP1	Tn <i>HK9</i> -Amplifikation von pMOD-Vektor	ATTCAGGCTGCGCAACTGT
pMOD RP1	Tn <i>HK9</i> -Amplifikation von pMOD-Vektor	GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG
SO38	Signatur-Detektion, unvariables Oligonukleotid	GAAGATCTCTAAGGAAGCTAAAATGGAG
RH171	Generierung der Signaturen	CTAGGGATCCAGATCTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NAGATCTATCCACGTTGAAAATCTCC
RH172	Generierung der Signaturen	GATGCAACCCTTAACCTTGC
M13 FP	Sequenzierung der Tn <i>HK9</i> -Insertionen	GTAAAACGACGGCCAGT
Tn <i>HK9</i> _{out}	Sequenzierung der Tn <i>HK9</i> -Insertionen	GGATCTCTAGAGGATCCCCG
HP169start <i>EcoRI</i>	Amplifikation des Gens <i>hp0169</i>	GGAATTCAGTTGAATTACTCTCTCC
HP169stop <i>XhoI</i>	Amplifikation des Gens <i>hp0169</i>	CCGCTCGAGACCTAATCTCTAAACGCC

2.2 Antikörper

2.2.1 Primäre Antikörper

Tabelle 6: Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Spezifität/(Tier)	Hersteller/Referenz
α -CagA	Polyklonales Antiserum gegen C-Terminus von CagA aus <i>H. pylori</i> 185-44 (Kaninchen)	Odenbreit <i>et al.</i> , 2000

α -VacA	Polyklonales Antiserum gegen VacA aus <i>H. pylori</i> 185-44 (Kaninchen)	Schmitt and Haas, 1994
α -P-Tyr (PY99)	Monoklonaler Antikörper (IgG _{2b}) gegen Phosphotyrosin (Maus)	Santa Cruz Biotechnologies
α -Pfr	Polyklonales Antiserum gegen Pfr aus <i>H. pylori</i> P1 (Kaninchen)	Bereswill <i>et al.</i> , 1998
α -AlpA	Polyklonales Antiserum gegen AlpA aus <i>H. pylori</i> P1 (Kaninchen)	Odenbreit <i>et al.</i> , 1999
α -AlpB	Polyklonales Antiserum gegen AlpB aus <i>H. pylori</i> P1 (Kaninchen)	Odenbreit <i>et al.</i> , 1999
α -ComB2	Polyklonales Antiserum gegen ComB2 aus <i>H. pylori</i> P1 (Kaninchen)	Hofreuter <i>et al.</i> , 1998
α -GST	Monoklonaler Antikörper gegen GST aus <i>Schistosoma japonicum</i> (Maus)	Amersham Pharmacia Biotech
α -Coll 1	Polyklonaler Antikörper gegen Typ1-Kollagen aus Kälberhaut (Kaninchen)	Rockland
α -C1q	Polyklonales Antiserum gegen menschliches C1q (Ziege)	Calbiochem

2.2.2 Sekundäre Antikörper/Protein A

Tabelle 7: Verwendete sekundäre Antikörper/Protein A

Antikörper	Spezifität	Hersteller/Referenz
α -rabbit-POX	Polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Ziege), Peroxidase-gekoppelt	Dianova
α -goat-POX	Polyklonaler Antikörper gegen Ziegen-IgG (Kaninchen), Peroxidase-gekoppelt	Sigma
ProteinA-AP	Protein A-gekoppelte alkalische Phosphatase	Sigma

2.3 Nährmedien

2.3.1 Nährmedien für *Helicobacter pylori*

Helicobacter-Serumplatten 36 g/l GC-Agar-Base, nach dem Autoklavieren Zugabe von 10 ml/l Vitaminmix, 80 ml/l Pferdeserum, 10 ml/l Vancomycin, 5 mg/l Trimethoprim, 1 mg/l Nystatin

Vitamin-Mix	100 g/l α -D-Glukose, 10 g/l L-Glutamin, 26 g/l L-Cystein, 0,1 g/l Cocarboxylase, 20 mg/l Fe(III)-Nitrat, 3 mg/l Thiamin, 13 mg/l p-Aminobenzoessäure, 0,25 g/l Nikotinamidadenindinukleotid (NAD), 10 mg/l Vitamin B12, 1,1 g/l L-Cystein, 1 g/l Adenin, 30 mg/l Guanin, 0,15 g/l L-Arginin, 0,5 g/l Uracil
<i>Brucella</i> -Medium	28 g/l <i>Brucella</i> -Broth
<i>Helicobacter</i> -Einfriermedium	<i>Brucella</i> -Medium, 20% Gyzerin, 10% FCS

2.3.2 Nährmedien für *E. coli*

LB-Flüssigmedium	20 g/l Lennox-L-Medium
LB-Agarplatten	32 g/l Lennox-L-Agar
<i>E. coli</i> -Einfriermedium	LB-Flüssigmedium/15% Glycerin

2.4 Antibiotika und andere Zusätze

Ampicillin	50 mg/l (LB-Flüssigmedium /-Agarplatten)
Chloramphenicol	30 mg/l (LB-Flüssigmedium /-Agarplatten) 6 mg/l (<i>Helicobacter</i> -Serumplatten)
Kanamycin	50 mg/l (LB-Flüssigmedium /-Agarplatten) 8 mg/l (<i>Helicobacter</i> -Serumplatten)
Streptomycin	250 mg/l (<i>Helicobacter</i> -Serumplatten)
X-Gal	40 mg/l
IPTG	1-4 mM

2.5 Bakterienanzucht

2.5.1 Anzucht von *H. pylori*

Die Anzucht von *H. pylori* erfolgte auf *Helicobacter*-Serumplatten mit oder ohne Antibiotikazusatz in Anaerobentöpfen oder in einem speziellen Brutschrank unter mikroaerophilen Bedingungen (Begasung mit Gasgemisch aus 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) bei 37°C. Zur Stammhaltung wurden die Bakterien in *Helicobacter*-Einfriermedium resuspendiert und bei -70°C eingefroren. Flüssigkulturen wurden

in *Brucella*-Medium angesetzt, das mit 10% FCS supplementiert und ebenfalls unter mikraerophilen Bedingungen in Anaerobentöpfen unter leichtem Schütteln (70 rpm) bei 37°C inkubiert wurde.

2.5.2 Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte auf LB-Agarplatten oder in LB-Flüssigmedium mit entsprechenden Medienzusätzen. Platten und Flüssigmedium wurden bei 37°C inkubiert, wobei die Flüssigkulturen bei 200 rpm geschüttelt wurden. Die Stammhaltung erfolgte in *E. coli*-Einfriermedium bei -70°C.

2.5.3 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterien

Die Bakterien wurden im gewünschten Medium mit einem Wattestab resuspendiert. Die optische Dichte der Kultur wurde im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda=550$ nm gegen das Medium als Leerwert gemessen. Bei Werten über 0,4 wurde die Kultur verdünnt.

2.6 Transformation von Bakterien

2.6.1 Herstellen elektrokompenter *E. coli*-Zellen

1 Liter LB-Medium wurde mit 10 ml einer über Nacht gewachsenen *E. coli*-Kultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C unter Schütteln bis zum Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,6-0,8 inkubiert. Die Bakterien wurden 15 min auf Eis gekühlt und abzentrifugiert (4°C, 2000x g, 10 min). Das Sediment wurde in 1 l eiskaltem H₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 0,5 l eiskaltem H₂O resuspendiert und abzentrifugiert. Nach erneutem Waschen des Bakteriensediments in 20 ml eiskalter 10% -iger Glyzerinlösung wurden die Zellen schließlich in 2-3 ml 10% -iger Glyzerinlösung aufgenommen, zu je 50 µl aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

2.6.2 Herstellen chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen mit RbCl (Hanahan, 1983)

200 ml LB-Medium wurden mit 2 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5-0,6 inkubiert. Die Zellen

wurden 5 min auf Eis abgekühlt und geerntet (4°C, 10 min, 2000x g). Nach Resuspendieren in 40 ml TFB I-Puffer wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert, abzentrifugiert, in 4 ml TFB II-Puffer suspendiert und für weitere 15 min auf Eis gestellt. Aliquots von 50-100 µl wurden bei -70°C eingefroren.

TFB I-Puffer: 30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% Glycerin, wurde mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,2 eingestellt und sterilfiltriert

TFB II-Puffer: 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15% Glycerin, pH 6,5 mit KOH eingestellt; sterilfiltriert

2.6.3 Elektrotransformation von *E. coli*-Zellen

Je ein Aliquot elektrokompeter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 0,2-1 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von maximal 2 µl vermischt. Das Gemisch wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 3 mm) pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mittels *Gene pulser*-Apparatur (BioRad) bei 25 µF und einem Widerstand von 200 Ohm. Daraufhin wurde der Küvetteninhalt in 1 ml vorgewärmtes LB-Medium transferiert und zur Expression der Antibiotika-Resistenzgene für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert, auf LB-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.6.4 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die kompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 0,2-1 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von maximal 5 µl gemischt. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 30 s in ein Wasserbad mit 42°C gehalten. Die Zellen wurden mit 1 ml LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Bakterien abzentrifugiert, auf LB-Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.6.5 Transformation von *H. pylori*

Zur Transformation der natürlich kompetenten *H. pylori*-Stämme wurden diese mit einem Wattestäbchen in *Brucella*-Medium, das mit 10% FCS supplementiert wurde, resuspendiert und auf eine OD₅₅₀ von 0,1-0,2 eingestellt. Je 1 ml dieser Suspension wurde in die Kavitäten einer 24-Napf-Zellkulturschale pipettiert und mit

2-10 µg DNA versetzt. Die Zellkulturschale wurde für 4-12 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert und auf Serumplatten mit geeigneter Antibiotikaselektion ausplattiert. Die Platten wurden für 5-7 Tage inkubiert.

2.7 Molekularbiologische Arbeiten

2.7.1 Isolierung und Auftrennung von Nukleinsäuren

2.7.1.1 Isolierung chromosomaler DNA

Von einer Serumplatte wurden ca. 50 mg Bakterienmaterial (etwa eine Impföse) abgenommen, direkt im Lysepuffer des QIAamp-Tissue-Kits der Firma Qiagen (Hilden) resuspendiert und mit 20 µl mitgelieferter Proteinase K-Lösung versetzt. Das weitere Vorgehen wurde nach Gebrauchsanleitung durchgeführt. Zur Elution der DNA von der Säule wurde H₂O verwendet.

2.7.1.2 Schnellpräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Holmes und Quigley, 1981)

Diese Methode wurde ausschließlich für *endA*⁻-Stämme verwendet. Dazu wurde das Bakterienmaterial einer Sechstel-LB-Agarplatte, die über Nacht bei 37°C inkubiert wurde, abgenommen und in 300 µl STET-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 30 µl Lysozym-Lösung (10mg/ml) zugegeben, der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert und dann 50 s im Wasserbad gekocht. Das nach 15-minütiger Zentrifugation bei 12000x g erhaltene Sediment aus Zellresten und Proteinen wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 200 µl Isopropanol für 10 min bei -20°C gefällt und 10 min bei 12000x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 700 µl 70% - igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 50 µl H₂O mit RNase (20 µg/ml) aufgenommen.

STET-Puffer: 8% Saccharose, 5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8,0

2.7.1.3 Präparative Plasmidisolierung

Plasmide, die in größeren Mengen oder höherer Reinheit benötigt wurden, wurden mit den Plasmidisolierungskits QIAprep-Spin-Miniprep-Kit (250) oder Plasmid-Midi-Kit der Firma Qiagen (Hilden) isoliert. Dabei erfolgte die Prozedur nach Gebrauchsanleitung.

2.7.1.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-Gelelektrophoresen in Horizontalgelkammern durchgeführt. Die Agarosekonzentration variierte je nach Größe der zu trennenden Fragmente zwischen 0,8 und 2% (w/v). Als Gel- und Laufpuffer wurde bei präparativen Auftrennungen TAE-, zur analytischen Trennung TBE-Puffer verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit mindestens 0,25 Volumen GEBS-Puffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte bei Standardgelen (Länge 10 cm, 1% Agarose) bei 60 V (TAE-Gele) bzw. 100 V (TBE-Gele), bis die gewünschte Auftrennung erreicht wurde. Nachdem die Gele für 10-20 min in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml H₂O) gefärbt und anschließend kurz gewässert wurden, konnten die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator bei 254 nm visualisiert und mittels Videodokumentationsystem abgebildet werden.

10x TBE-Puffer: 162 g/l Tris, 27,5 g/l Borsäure, 9,3 g/l EDTA

50x TAE-Puffer: 242 g/l Tris, 57,1 ml/l Eisessig, 50 mM EDTA

GEBS-Puffer: 20% Glycerin, 50 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,5% Sarkosyl

2.7.1.5 Reinigung von DNA

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten wurden diese einer Elektrophorese in einem TAE-Agarosegel unterzogen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in 0,1% (w/v) Methylenblau-Lösung für 20 min gefärbt und anschließend bis zum Sichtbarwerden der DNA-Banden im Gel in H₂O entfärbt. Die zu reinigende DNA-Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die weitere Reinigung wurde gemäß Anleitung des Ultra Clean TM15-Kits (Fa. Dianova) durchgeführt.

2.7.1.6 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrierung von Nukleinsäuren wurden dem Ansatz 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 4,8) zugegeben. Zur Präzipitation der Nukleinsäuren folgte die Zugabe des 2-3 -fachen Volumens eiskalten 96% -igem Ethanols (v/v) oder 0,8 Volumens Isopropanols und eine Inkubation bei -20°C für 15 min. Anschließend wurde die Probe bei 18000x g für 30 min zentrifugiert. Das Sediment wurde einmal mit eiskaltem Ethanol (70% [v/v]) gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und im gewünschten Volumen H₂O aufgenommen.

2.7.1.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch Messung der Extinktion bei 260nm in Quarzküvetten bestimmt. Dabei entspricht die Extinktion von 1 den folgenden Konzentrationen:

-doppelsträngige DNA: 50 µg/ml

-einzelssträngige DNA: 31 µg/ml

Die Reinheit der DNA ließ sich ebenfalls durch photometrische Messungen überprüfen. Dabei gilt für eine proteinfreie DNA-Lösung ein Verhältnis OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ von 1,8 (Sambrook *et al.*, 1989). Häufig reichte es allerdings aus, die DNA-Konzentration auf Grund des Vergleichs der Intensität der Banden im Agarose-Gel mit denen des verwendeten DNA-Längenstandards abzuschätzen.

2.7.2 Enzymatische Modifikation von DNA

2.7.2.1 Spaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Herstellers für 1,5-3 h. Bei Doppelverdauen wurden Puffer gewählt, in denen beide verwendeten Restriktionsendonukleasen eine Aktivität von mindestens 50% aufwiesen. Der Erfolg der Spaltung wurde durch Auftragen eines Aliquots in der Agarosegelelektrophorese analysiert. Zum Abstoppen der Spaltungsreaktion wurden Ansätze mit Restriktionsendonukleasen, die sich durch Erwärmen inaktivieren ließen, für 15 min bei 70°C erhitzt.

2.7.2.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von Vektor-DNA und DNA-Fragmenten wurde in dem vom Hersteller (Fa. Roche) mitgelieferten Puffersystem in 10 µl-Ansätzen durchgeführt. Die Ansätze enthielten jeweils 0,1-0,5 µg Vektor-DNA und das zu ligierende Fragment in vierfachem molarem Überschuss. Nach der Zugabe von 1 U T₄-DNA-Ligase (Fa. Roche) erfolgte die Ligation für 4-12 h bei 16°C.

2.7.3 *In vitro*-Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.7.3.1 Allgemeine PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur exponentiellen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente verwendet, die zur Klonierung von Genen aus *H. pylori* und zur Detektion spezieller DNA-Anordnungen genutzt wurden. Für Anwendungen, bei denen die amplifizierten Fragmente später kloniert werden sollten, wurde die „Expand-High-Fidelity-Polymerase“ (Roche) verwendet, die eine 3'-5'-Korrekturfunktion besitzt. Für Detektionszwecke wurde die Taq-DNA-Polymerase (Fa. PAN) verwendet. Je nach Anwendung variierte das Reaktionsvolumen zwischen 20 und 100 µl. Pro 100 µl-Ansatz wurden 2-10 ng der Matrizen-DNA, je 100 pmol der Oligonukleotide, jeweils 200 µmol aller dNTPs, 1x PCR-Reaktionspuffer und 1-2 U Taq-DNA-Polymerase verwendet. Die DNA wurde zunächst für 4 min in einem Thermocycler bei 94°C denaturiert. Dann erfolgte die Amplifikation der DNA-Fragmente in 25-30 Zyklen: 30 s Denaturieren bei 94°C, Hybridisierung der Oligonukleotide mit der Matrize für 30 s-1 min bei 48-56°C, 1 min/kBp Amplifikation der Fragmente bei 72°C. Zum Auffüllen von Abbruchprodukten erfolgte am Schluss ein Schritt mit 72°C für 5 min. Nach der PCR wurden Aliquots auf einem TBE-Agarosegel analysiert.

2.7.3.2 Signatur-Detektions-PCR

Zur spezifischen Detektion der Signaturen der TnHK9-Transposons wurde eine PCR-Reaktion eingesetzt, bei der signaturspezifisch ein 896 Bp Fragment des Transposons amplifiziert wurde. Die PCR-Detektion erfolgte in 20 µl-Reaktionsansätzen mit je 20 pmol des konstanten Oligonukleotids SO38 und den variablen Oligonukleotiden TAG 3-64. Zusätzlich zum Reaktionspuffer wurden 40

μmol dNTPs, 30 ng Matrizen-DNA, 30 μmol MgCl_2 und 0,3 U Taq-DNA-Polymerase gegeben. Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen: 94°C für 5 min, 30 Zyklen mit 94°C für 30 s, 52°C für 1 min, 72°C für 1 min und einer abschließenden Extensionszeit von 5 min bei 72°C. 5-10 μl der Reaktion wurden auf einem 1% -igen TBE-Agarosegel analysiert.

2.7.4 Detektion von Nukleinsäuren durch nicht-radioaktive Southern-Blot-Hybridisierung

Zur Detektion eines bestimmten DNA-Sequenzabschnitts wurde restringierte chromosomale DNA auf einem TAE-Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde daraufhin im Ethidiumbromidbad gefärbt und mit einem Längenstandard fotografisch dokumentiert. Zur teilweisen Depurinierung wurde das Gel für 20 min in einer 0,25 M HCl-Lösung geschwenkt. Anschließend wurde die DNA 20 min in Denaturierungspuffer denaturiert und dann für ebenfalls 20 min in Neutralisierungspuffer inkubiert. Das Gel wurde mit 10x SSPE überschichtet und weitere 20 min inkubiert. Schließlich wurde die DNA mit Hilfe einer Vakuum-Blotapparatur mit einem Druck von 50 mbar für 1 h auf eine Hybond N⁺-Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem UV-Crosslinker mit 0,125 J/cm² kovalent an die Membran gebunden. Die Membran wurde für eine Stunde bei 42°C im Vorhybridisierungspuffer inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 100 ng der als Sonde benutzten DNA bei 100°C für 5 min im Wasserbad denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Die kovalente Kopplung der einzelsträngigen DNA mit Peroxidase erfolgte durch Zugabe von 10 μl Markierungsreagenz (Fa. Amersham Pharmacia Biotech), 10 μl Glutaraldehydlösung und Inkubation für 10 min bei 37°C. Die so markierte Sonden-DNA wurde zum Vorhybridisierungspuffer gegeben und die Membran in dieser Lösung bei 42°C über Nacht inkubiert. Die Membran wurde 2 mal für je 20 min bei 42°C im primären Waschpuffer geschwenkt und anschließend 2 mal für je 5 min in 2x SSPE gewaschen. Zur Detektion wurden die Detektionslösungen 1 und 2 (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) zu gleichen Teilen gemischt und die Membran darin für 1 min inkubiert. Die Membran wurde schließlich in eine Folie gewickelt und bis zum Auftreten der Signale gegen einen Röntgenfilm exponiert.

20x SSPE-Puffer: 3,6 M NaCl, 0,2 M NaH_2PO_4 , 20 mM EDTA, 0,21 M NaOH

Denaturierungspuffer: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

Neutralisierungspuffer: 1 M Tris/HCl pH 7,5, 3 M NaCl

Hybridisierungspuffer: Hybridisierungspuffer (Amersham) mit 500 mM NaCl und 5% Blockierungsreagenz (Amersham)

Primärer Waschpuffer: 0,5x SSPE, 6 M Harnstoff, 0,4% SDS

2.7.5 *In vitro*-Transposition

Die Integration von Transposons zur Mutagenese von *H. pylori*-DNA erfolgte über ein Tn5-basierendes *in vitro*-Transpositions-System (Goryshin und Reznikoff, 1998), das eine effiziente und zufällige Transposon-Insertion in die Ziel-DNA ermöglicht. Hierfür wurde zunächst das TnHK9-Transposon mit den Oligonukleotiden pMOD FP1 und pMOD RP1 mit dem Transposonplasmid pHK9 als Matrize mittels PCR amplifiziert und durch Agarosegelelektrophorese gereinigt. Die *in vitro*-Transpositionsreaktion erfolgte in einem 10 µl-Reaktionsansatz mit 1 µl 10x Reaktionspuffer, 0,2 µg der pSO50-Genbankplasmid-DNA und einer equimolaren Menge Transposon-DNA in H₂O. Nach Zugabe von 1 U EZ::TN-Transposase wurde der Ansatz für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 1 µl 1% SDS-Lösung abgestoppt und für 10 min bei 70°C erhitzt. Je 1 µl des Ansatzes wurde zur Transformation von elektrokompenten *E. coli*-DH5α verwendet, die auf LB-Platten, supplementiert mit Chloramphenicol, ausplattiert wurden. Um eine größtmögliche Anzahl an Mutanten zu erhalten, wurde so sukzessive jeweils der gesamte Reaktionsansatz zur Transformation eingesetzt.

2.7.6 Klonierung von PCR-Produkten über TOPO-TA-Cloning® (Fa. Invitrogen)

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte teilweise durch die DNA-Verknüpfung mittels Topoisomerase-Aktivität. Bei der Kettenverlängerung während der PCR wird durch die unspezifische terminale Transferase-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase ein Desoxyadenosin am 3'-Ende des synthetisierten DNA-Strangs angehängt. Der Vektor pCR2.1 besitzt ein überhängendes terminales 3'-Desoxythymidin und ist mit der Topoisomerase I des Vaccinia-Virus gebunden. Zur Klonierung wurden die PCR-Produkte gereinigt und laut Anleitung eingesetzt.

2.7.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte bei der Firma GATC in Konstanz nach der Methode von Sanger auf einem Kapillarsequenziergerät. Die Sequenzierung erfolgte hauptsächlich mit Plasmid-DNA, z.T. wurde auch direkt mit chromosomaler DNA von *H. pylori* als Sequenziermatrize gearbeitet.

2.8 Biochemische Arbeiten

2.8.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen proteinhaltiger Lösungen erfolgte durch den Farbbindungstest nach Bradford (Bradford, 1976). Nach Zugabe von 1 ml Bradford-Reagenz zu 100 µl der zu testenden Lösung (1-15 µg Protein) wurde der Reaktionsansatz 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Extinktion gegen einen Blindwert bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Für jede Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit BSA aufgenommen.

Bradford-Reagenz: 0,01% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue G250, 5% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Phosphorsäure (88% ig).

2.8.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970), wobei für das Trenngel Acrylamidkonzentrationen von 6-12% zum Einsatz kamen. Zur Elektrophorese wurde die Probe 1:1 mit SDS-Probenpuffer (2x) versetzt und 10 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben in die Taschen der Minigele pipettiert und die Proteine bei einer Spannung von 120 V aufgetrennt. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine alternativ entweder durch eine Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue (Weber und Osborn, 1969), oder eine Silberfärbung nach Blum (1987) sichtbar gemacht.

2.8.3 Fällung von Proteinen

Zur Proteinprobe wurde auf Eis unter leichtem Rühren Ammoniumsulfat bis zur gewünschten Prozentigkeit zugegeben und die Probe 1 h weitergerührt. Anschließend wurden die Proben während eines Zentrifugationsschritts (20000x g,

1 h, 4°C) sedimentiert. Danach wurde das Sediment einmal mit dem Probenpuffer gewaschen und resuspendiert. Die resuspendierte Proteinlösung wurde über Nacht bei 4°C in Dialyseschläuchen gegen 4 l Probenpuffer dialysiert.

2.8.4 Heterologe Überproduktion und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur heterologen Überproduktion von Proteinen wurde das Glutathion S-Transferase System (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) verwendet, bei dem die Proteine als N-terminales GST-Fusionsprotein in *E. coli* überproduziert und mittels Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose gereinigt werden. Die zu exprimierenden Gene wurden im korrekten Leserahmen an das 3'-Ende des *gst*-Gens im Vektors pGEX4T3 fusioniert und in den *E. coli*-Stamm BL 21 transformiert. Die Bakterien wurden in 200 ml bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD₅₅₀ von 0,8 wurde die Expression des unter Kontrolle eines *tac*-Promoters stehenden Fusionsgens mit 1 mM IPTG induziert. Nach zwei Stunden wurde die Bakterienkultur für 15min auf Eis gestellt und bei 6000x g abzentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 4ml eiskaltem Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM CaCl₂) aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (15000x g, 4°C) und der Überstand abgenommen. Zum Überstand wurden 400 µl von einer Glutathion-Sepharose 4B-Lösung gegeben, die zuvor zwei Mal mit Puffer gewaschen wurde. Nach einer halbstündigen Inkubation bei 4°C wurde die Sepharose bei 500x g sedimentiert und mit 2 ml Puffer gewaschen. Der Waschschrift wurde drei Mal wiederholt. Anschließend wurde das gebundene GST-Fusionsprotein mit Puffer mit 10 mM Glutathion eluiert. Das Eluat wurde gegen 3 l eiskalten Puffer ü.N. dialysiert.

2.8.5 Immuno-Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Trockenblot-Verfahren mit einer Semi-Dry-Elektroblot-Apparatur auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Kontakt zwischen der Membran bzw. dem Acrylamidgel und den Graphitelektroden wurde über je zwei dünne und zwei dicke Whatman-Filterpapiere hergestellt, die mit Transferpuffer getränkt waren. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte bei 1 mA/cm² für eine Stunde. Danach wurde die

Membran für eine Stunde in TBS/3% BSA [w/v] abgesättigt. Zur Bindung des ersten Antikörpers wurde das Serum 1:1000-1:5000 in TBS/1% BSA verdünnt auf die Membran gegeben und für mindestens eine Stunde oder über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit TBS/0,05% [v/v] Tween 20 wurde entweder der 2. Antikörper (Peroxidase-gekoppelt) bzw. Protein A (alkalische Phosphatase-gekoppelt) in einer 1:2500-Verdünnung zugegeben, für eine Stunde inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Die Entwicklung mit alkalische Phosphatase-Konjugaten erfolgte in einer Plastischale, die mit 10 ml Detektionslösung gefüllt war, bis zum Auftreten der Banden. Für die Entwicklung mit Peroxidase-Konjugaten wurden ECLTM Western-Blot-Reaktionsdetergenzien (Amersham) verwendet und die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

TBS-Puffer: 150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5

Transferpuffer: 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol, 25 mM Tris/HCl, pH 8,3

Detektionslösung (AP-Konjugate): 7 mM MgCl₂, 100 mg/l NBT, 50 mg/l BCIP, 0,1 M Tris/HCl, pH 9,6

2.8.6 Test auf Protease-Aktivität

Proteaseaktivitäten von Lösungen wurden in einem halbquantitativen Test mit Azocoll als Substrat durchgeführt. Dabei wurden 1 mg des unlöslichen Azocolls in 1 mg Testansatz verwendet. Proteinlösungen wurden in variablen Volumina zwischen 10 und 100 µl mit dem Testpuffer versetzt. Die Proben wurden für 14 h bei 37°C auf einem Schüttelinkubator bei 1000 rpm inkubiert, nicht verdautes Azocoll bei 18000x g in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand bei 442 nm im Photometer analysiert. Als Nullwert diente ein Testansatz ohne zugegebene Proteinlösung, da auch ohne Proteaseaktivität eine geringe Freisetzung des Azofarbstoffes beobachtet wird.

Testpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM CaCl₂

2.8.7 Test auf Kollagenaseaktivität

Tests auf Kollagenaseaktivität von Proteinlösungen erfolgten mit Typ I-Kollagen aus Kälberhaut (Sigma). Das Kollagen wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in 100 mM Essigsäure gelöst. 10 µl dieser Lösung wurden mit 70 µl Testpuffer und

20 µl Probe versetzt und bei 37°C inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden 10 µl des Ansatzes entnommen und mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Analyse der Kollagenaseaktivität erfolgte densitometrisch anhand der Kollagen-Bandenintensitäten im Western-Blot mit einem Kollagen-TypI-spezifischen polyklonalen Antikörper.

Testpuffer: 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM CaCl₂

2.8.8 Test auf C1q-Degradation

Für den Test auf Degradation des Komplement-Bestandteils C1q wurde C1q-Testpuffer 10:1 mit einer wässrigen Lösung von humanem C1q (20 mg/ml) versetzt und mit bakteriellen Lysaten von *H. pylori* inkubiert. Die Auswertung erfolgte analog zu der des Kollagenase-Tests, allerdings wurde im Western-Blot ein anti-C1q-Antikörper zur Detektion verwendet.

C1q-Testpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 5mM CaCl₂

2.8.9 Test auf Ureaseaktivität

Die Ureaseaktivität von *H. pylori*-Mutanten wurde durch pH-Wert-Änderung colorimetrisch bestimmt. Dazu wurden Kolonien mit der Impföse von einer Agarplatte abgenommen, in 0,5 ml Urease-Testmedium resuspendiert und für 5 min inkubiert. Urease-positive Klone bewirken in dieser Zeit einen deutlichen Farbumschlag des pH-Indikators von rosa nach rot.

Urease-Testmedium: 1 g Pepton, 1 g Glukose, 5 g NaCl, 1,2 g Na₂HPO₄, 0,8 g KH₂PO₄, 4 mg Phenolrot, pH 6,8, H₂O ad 1000 ml

2.8.10 Test auf Motilität

Die Beweglichkeit von *H. pylori*-Mutanten wurde anhand der Koloniegröße auf Weichagarplatten ermittelt. Dazu wurde eine Kolonie mit einem Zahnstocher abgenommen und durch einen Stich auf eine Weichagarplatte übertragen. Die Platte wurde drei Tage inkubiert, dann wurde der Durchmesser der Kolonie bestimmt. Zur Kontrolle wurde jede Weichagarplatte zusätzlich mit einer motilitätsdefekten *H. pylori*-Mutante und einem motilen *H. pylori*-Wildtyp beimpft.

Weichagar: 28 g *Brucella*-Medium, 0,4% Agar, 45 ml Pferdeserum, H₂O ad 1000ml

2.9 Tierexperimente

2.9.1 Tierhaltung

Die Wüstenrennmäuse wurden in Käfigen aus Kunststoff der Marke Techniplast „Typ III hoch“ (25 x 40 x 20 cm) gehalten, deren Boden mit Sägespänen gefüllt war. Den Tieren wurde zu jeder Zeit keimarmes Trockenfutter und steriles, frisches Wasser geboten. Die Käfige waren über ein Rohrsystem an einen Vakuumgenerator angeschlossen. Die Anzahl der Tiere pro Käfig betrug 2-4, wobei alle Tiere in einem Käfig das gleiche Geschlecht hatten. Für die orogastrale Infektion mit *H. pylori* wurden sowohl weibliche als auch männliche Tiere verwendet, die zwischen 9 und 14 Wochen alt waren. Die Wüstenrennmäuse stammten von der Firma RCC (Schweiz) und aus eigener Zucht am Max von Pettenkofer-Institut. Im Tierstall herrschte ein 12 h/12 h-hell/dunkel-Rhythmus bei einer durch eine Klimaautomatik regulierten Temperatur von 20°C. Die Luftfeuchtigkeit konnte nicht reguliert werden.

2.9.2 Orogastrale Infektion der Wüstenrennmäuse mit *H. pylori*

Die Infektion der Wüstenrennmäuse mit *H. pylori* erfolgte orogastral. Dazu wurden die Bakterien auf Serumplatten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen kultiviert, kurz vor der Infektion mit einem Wattestab von der Platte abgenommen und in *Brucella*-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde mit *Brucella*-Medium auf eine OD₅₅₀ von 3,3 eingestellt. Zur Infektion wurde diese Suspension in eine 1 ml-Spritze aufgezogen, die mit einer Orogastralkanüle versehen war. Die Tiere wurden mit der Hand am Nacken fixiert und mit 300 µl der Bakteriensuspension (10⁹ Bakterien) orogastral infiziert. Die Infektion wurde an drei konsekutiven Tagen wiederholt, wobei die für die Infektion verwendeten *H. pylori*-Mutanten einzeln weiterkultiviert und jeweils kurz vor der Infektion vereinigt wurden.

2.9.3 Quantitative Reisolierung von *H. pylori* aus Wüstenrennmaus-Mägen

21 Tage nach der letzten Infektion wurden die Tiere durch Begasen mit CO₂ in einem geschlossenen Gefäß getötet. Die toten Tiere wurden auf einer Styroporunterlage auf dem Rücken liegend fixiert. Die Bauchdecke wurde mit einer Schere geöffnet. Der Magen wurde daraufhin am Übergang des Oesophagus zum

Vormagen und am Pylorus abgeschnitten und in ein 15 ml-Schraubdeckelgefäß mit 10 ml *Brucella*-Medium gegeben. Zum Homogenisieren des Magengewebes wurde dieser zunächst in zwei Hälften geschnitten und in *Brucella*-Medium geschwenkt, um den Mageninhalt zu entfernen. Daraufhin wurde der Magen gewogen. Die Magenhälften wurden weiter mit einer Schere zerkleinert und zusammen mit 2 ml *Brucella*-Medium im Glashomogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde 1:10 mit *Brucella*-Medium verdünnt, und 5x 100 µl davon wurden auf *Helicobacter*-Serumplatten mit Streptomycin- und Chloramphenicol-Zugabe ausplattiert. Nach 5-7 Tagen wurden die Kolonien eines Wüstenrennmaus-Magens ausgezählt und zur Isolierung chromosomaler DNA vereinigt.

2.9.4 Chemikalien und Apparaturen

Organische und anorganische Chemikalien wurden in der Regel von den Firmen Merck, Carl Roth GmbH und Sigma bezogen. Bei den Nährmedien stammte der GC-Agar von der Firma Creatogen, *Brucella* Medium von Becton Dickinson, Lennox-L-LB-Agar und Lennox-L-LB-Medium von Gibco BRL. Die Enzyme für die Molekularbiologie stammten von Roche, die Taq-Polymerase für die Amplifikation der Signaturen von der Firma PAN und der Desoxyribunukleinsäure-Mix von Fermentas. Der verwendete Standard für die Proteinarbeiten stammte ebenfalls von Fermentas. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech synthetisiert.

Die Anzucht von *H. pylori* erfolgte im „Microincubator MI 22 C“ der Firma Scholzen oder in Anaerobentöpfen von Fritz Gössner GmbH. Die weiteren verwendeten Geräte waren Laborstandard-Geräte.

3 ERGEBNISSE

3.1 Identifikation *in vivo* essentieller Gene bei *H. pylori*

3.1.1 Validierung eines geeigneten Tiermodells

Eine Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Durchführung einer Untersuchung zur Überlebensfähigkeit bakterieller Mutanten im Wirtsorganismus ist das Vorhandensein eines geeigneten Tiermodells. In den letzten Jahren hat sich das Modell der Mongolischen Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*) als geeignet für Untersuchungen zum Infektionsprozess von *H. pylori* herausgestellt.

Der ursprünglich aus dem Magengewebe eines Patienten mit Duodenalulkus isolierte *H. pylori*-Stamm CPY3401 (Karita *et al.*, 1991) wurde nach Passage durch die Wüstenrennmaus in G1.1 umbenannt und zeigte für die durchzuführenden Versuche gute Reisolierungsraten von fast 10^5 Bakterien pro Wüstenrennmausmagen (Wirth *et al.*, 1998). Dieser Stamm wurde für die hier durchgeführten Infektionsexperimente ausgewählt.

In einem ersten Experiment wurden drei Tiere mit 10^9 Bakterien in 300 µl Brucella-Medium an drei konsekutiven Tagen mit dem *H. pylori*-Stamm G1.1 infiziert, der Magen nach 12 Tagen isoliert, homogenisiert und ein Aliquot auf Serumplatten inkubiert. Eine quantitative Reisolierung scheiterte allerdings an zusätzlich co-isolierter Magenflora. Eine mit dem reisolierten bakteriellen Gemisch durchgeführte Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung mit einer *H. pylori*-spezifischen Sonde (Trebesius *et al.*, 2000) zeigte aber das Vorhandensein von *H. pylori* im Reisolat.

Diese Versuche zeigten die Notwendigkeit, den für die Untersuchungen zur Kolonisierungsfähigkeit verwendeten Stamm mit einem Selektionsmarker zu versehen, um den Stamm frei von weiterer Magenflora reisolieren zu können. Dazu wurde der Stamm G1.1 mit dem Suizidplasmid pEG21 transformiert, das ein *rpsL*-Gen trägt, bei dem ein Nukleotidaustausch von AAA durch AGA zum Aminosäureaustausch von Lysin durch Arginin an Position 43 des kodierten S12-Proteins führt (Fischer *et al.*, 1999). Diese Punktmutation führt nach homologer Rekombination in das G1.1-Genom zur Ausbildung einer Streptomycin-Resistenz. Die nach Selektion auf Serumplatten mit Streptomycin erhaltenen Klone wurden

Q1 genannt. Ein erneuter Test auf Kolonisierungsfähigkeit des modifizierten Stamms zeigte, dass sich der Stamm frei von Kontaminanten reisolieren ließ, allerdings mit einer im Vergleich zur Literatur deutlich geringeren Reisolierungsrate von 3×10^3 Bakterien pro Gramm Magengewebe. Um die Reisolierungsraten zu erhöhen, wurde in vier weiteren Infektions-Runden je ein reisolierter Klon weiter passagiert und für eine neue Infektion eingesetzt.

Durch diese Adaptationsinfektionen wurde am Ende ein Stamm erhalten, der Reisolierungsraten zwischen 10^5 und 10^6 Bakterien pro Gramm Magen aufwies. Dieser an die Wüstenrennmaus adaptierte Stamm wurde Q1RIII genannt und für alle nachfolgenden Infektionsanalysen verwendet. Im Weiteren wird der Stamm aber als Q1 bezeichnet.

3.1.2 Das Wüstenrennmausmodell ist für die Anforderung einer STM-Mutantensuche geeignet

Die STM-Methode bietet die Möglichkeit, eine Vielzahl bakterieller Mutanten simultan auf ihre Fähigkeit zur Persistenz im Wirt zu überprüfen. Diese Methode führt nur dann zu reproduzierbaren Ergebnissen, wenn sich im Wirtsorganismus multiple Infektionen mit unterschiedlichen Mutanten etablieren lassen und die Anzahl diverser Mutanten so gewählt wird, dass alle unterschiedlichen kolonisierenden Mutanten zuverlässig aus dem Wirtsgewebe reisoliert werden können.

Um zu überprüfen, ob sich eine Koinfektion mit verschiedenen *H. pylori* Q1-Mutanten im Magen der Wüstenrennmaus stabil etablieren lässt, wurden 10 STM-Mutanten mit unterschiedlicher Signatur ausgewählt. Diese wurden zu gleichen Teilen gemischt und zur oralen Infektion von 10 Wüstenrennmäusen eingesetzt (Generierung und Detektion der *H. pylori*-Mutanten siehe 3.1.3 und 3.1.6). Eine Mutante trug eine Transposoninsertion im Urease-Gen *ureB* (*hp0072*), eine weitere in dem Flagellin-Gen *flaA* (*hp0601*). Beide Gene sind in anderen Tiermodellen bereits als für die Kolonisierung essentiell beschrieben worden (siehe Tabelle 1). Die weiteren Mutanten besaßen Insertionen in den Genen *hp0407*, *hp0755* (2 Mutanten mit unterschiedlichen Signaturen), *hp0094*, *hp0138*, *hp0635*, *hp1225* und im 23S-rRNA-Gen *rrnB23s*. Die Beteiligung am Infektionsprozess von *H. pylori* wurde bisher für keines dieser Gene beschrieben. Drei Wochen nach der Infektion wurde eine quantitative Reisolierung durchgeführt

und das Vorhandensein der einzelnen Mutanten im Gemisch der reisolierten *H. pylori*-Kolonien anhand der Signatur-spezifischen PCR (siehe Kapitel 3.1.3) überprüft (Abb. 1). Aus keinem Tier konnte die *flaA*- oder *ureB*-Mutante reisoliert werden, während alle anderen Mutanten detektiert werden konnten. Dabei wurden die untersuchten Mutanten zwischen 8 und 10 mal in den 10 damit infizierten Tieren gefunden.

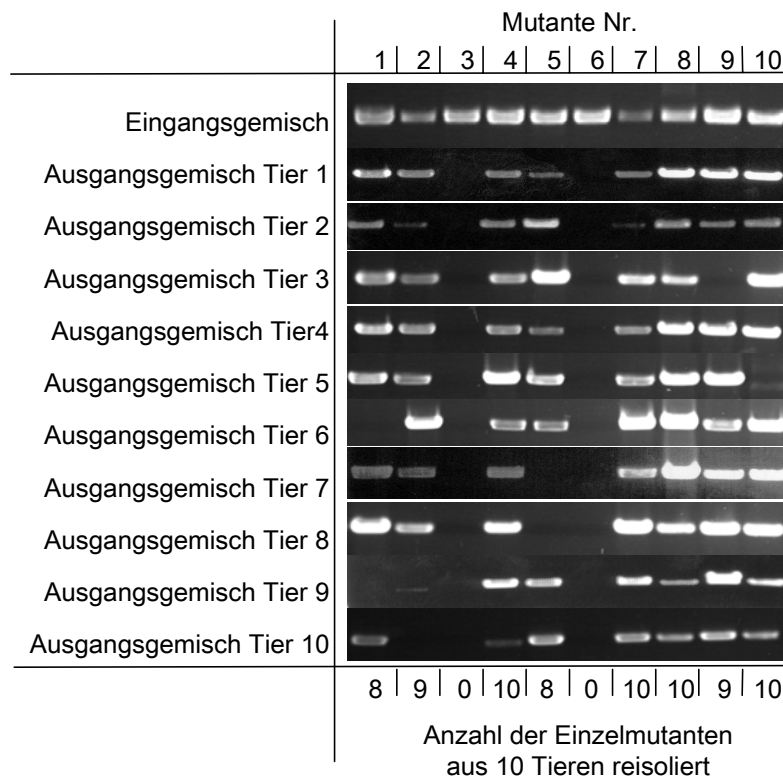


Abb. 3: Statistische Validierung des Wüstenrennmaus-Modells bei multipler Infektion

10 Wüstenrennmäuse wurden mit einem Gemisch aus 10 *H. pylori* STM-Mutanten mit Transposoninsertionen in folgenden Genen infiziert: 1: *hp0635*, 2: *hp0094*, 3: *hp0072*, 4: *hp1225*, 5: *hp0138*; 6: *hp0601*, 7: *hp0755*, 8: *rrnB23s*, 9: *hp0755*, 10: *hp0407*. Alle Mutanten trugen unterschiedliche Signaturmarkierungen. 3 Wochen nach der Infektion wurden die Mutanten reisoliert und das Vorhandensein jeder einzelnen Mutante mittels signaturspezifischer PCR (siehe Kapitel 3.1.3) überprüft. In der Abb. 3 sind die resultierenden 896 Bp großen PCR-Banden dargestellt.

Dieser Infektionsvorversuch verdeutlichte, dass mit dem verwendeten Tiermodell multiple Infektionen mit unterschiedlichen *H. pylori*-Mutanten möglich sind, die sich nach drei Wochen Infektionsdauer zuverlässig detektieren lassen. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass das Modell und die Infektionsdauer von 3 Wochen geeignet und ausreichend sind, um *in vivo* essentielle Gene von *H.*

pylori zu identifizieren, was am Beispiel einer Urease- und einer Flagellin-Mutante gezeigt wurde.

3.1.3 Entwicklung eines PCR-basierenden Detektionssystems zur Identifikation kolonisierender STM Mutanten

In der ursprünglichen STM-Applikation bei *S. typhimurium* bestanden die Signaturen, mit denen die Mutanten individuell markiert wurden, aus halbzufällig generierten 40 Bp-DNA-Sequenzen, die von einer invariablen Region flankiert wurden. Diese dienten als Oligonukleotid-Bindungsstelle für die Amplifikation der variablen Region durch PCR mit radioaktiv markierten Nukleotiden. Das resultierende Amplifikat wurde schließlich als Sonde in einer Koloniehybridisierung verwendet, um kolonisierende Mutanten zu detektieren (Hensel *et al.*, 1995).

In einer Weiterführung der Methode wurden die Koloniehybridisierungen durch Dot-Blot-Hybridisierung mit gereinigter DNA ersetzt und die Anzahl der verwendeten Signaturen beschränkt, um Probleme mit Kreuzhybridisierungen und unterschiedlich starken Hybridisierungssignalen zu minimieren. Dennoch ergaben sich durch schwache Hybridisierungssignale falsche Interpretationen von STM-Daten (Lehoux *et al.*, 1999). Bei einer auf negativer Selektion beruhenden Methode wie der STM ist die eindeutige Detektion der positiven Signale aber eine wichtige Voraussetzung zur Identifikation kolonisierungsdefizienter Mutanten.

Anstelle einer Hybridisierung wurde deshalb ein System entwickelt, bei dem die Signaturen mittels PCR detektiert werden, da sie die schnellere, selektivere und in dieser Anwendung sensitivere Methode darstellt. Zudem ist die Handhabung eines PCR-basierten Signatur-Detektionssystems weitaus einfacher, da die Schritte der Generierung und des Markierens der Sonden entfallen. Die PCR-Amplifikation eines DNA-Stücks definierter Länge bietet im Vergleich zur Hybridisierung den weiteren Vorteil, dass die Länge des Amplifikates als Detektionskriterium hinzukommt und so eventuelle Kreuzhybridisierungen an anderen Bereichen des Chromosoms ausgeschlossen werden können.

Bei der Detektion der Signaturen wurde mit SO38 ein konstantes Oligonukleotid verwendet, das jeweils mit einem variablen, Signatur-spezifischen Oligonukleotid (TAG 3-64) gepaart (siehe Abb. 4) wurde. Das resultierende Amplifikat besitzt eine Länge von 896Bp und wurde durch Elektrophorese mittels

eines 1,5% igen Agarosegels aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

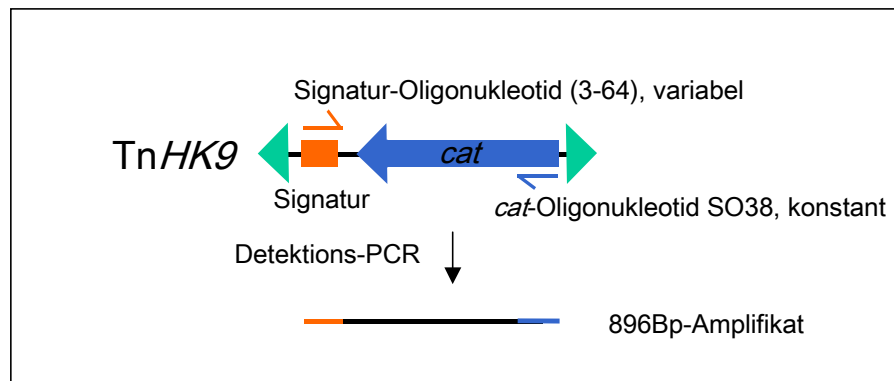


Abb. 4: Schema der PCR-Detektion der Signaturmarken von *H. pylori* STM-Mutanten

Zur Detektion der Signatur der verschieden markierten Transposons wurden Oligonukleotide entwickelt, die mit der Signatursequenz hybridisieren. Für die Detektion einer speziellen Signatur wurde dieses Signaturoligonukleotid mit dem konstanten Oligonukleotid SO38, das mit einer Sequenz im Startbereich des *cat*-Gens des TnHK9-Transposons hybridisiert, zusammen in einer PCR-Amplifikation eingesetzt. Das Vorhandensein dieser Signatur in einem Gemisch unterschiedlich signaturmarkierter STM-Mutanten-DNA lässt sich so an dem amplifizierten 896 Bp-Fragment erkennen.

3.1.4 Konstruktion einer Gruppe von definierten STM-Transposons

Da, anders als in den meisten bakteriellen Systemen, bei denen die STM-Methode bereits erfolgreich angewendet wurde, in *H. pylori* kein Transpositionssystem etabliert ist, wurde die Mutagenese der *H. pylori*-Genbank *in vitro* durchgeführt.

Als System diente dabei das Tn5 basierte EZ::TN-System (Epicentre). Die molekularen Signaturen wurden mit den Oligonukleotiden RH171 synthetisiert, die die komplett randomisierten 20 Nukleotide der Signatur-Region innerhalb von je 20 Nukleotiden einer invariablen Region enthalten. Um die Klonierung dieses kleinen Fragmentes zu erleichtern, wurde am 3'-Ende von RH171 ein zum stromabwärts gelegenen Bereich des *cat*-Gens im Transposonplasmid pTnMax5 (Haas *et al.*, 1993) komplementärer Bereich angefügt (siehe Abb. 5). Auf diese Weise wurden die Signaturen in einer PCR mit den Oligonukleotiden RH171 und RH172 mit dem *cat*-Gen aus dem Transposon TnMax5 fusioniert. Das resultierende PCR-Produkt wurde anschließend in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert. Von dort wurde das Fragment als *Hind*III/*Xba*I-Fragment in den EZ::TN-Transposonkonstruktionsvektor pMOD zwischen die invertierten

Sequenzwiederholungen des Transposons kloniert (siehe Abb. 5). Diese Transposons wurden TnHK9 genannt.

Da die Oligonukleotidmischung RH171 im variablen Bereich von 20 Nukleotiden zufällig synthetisiert wurde, ergibt sich eine theoretisch mögliche Anzahl von 4^{20} unterschiedlich signaturmarkierter Transposons. Zunächst wurden ca. 200 *E. coli*-Klone, die das Transposonplasmid pTnHK9 enthielten, eingefroren.

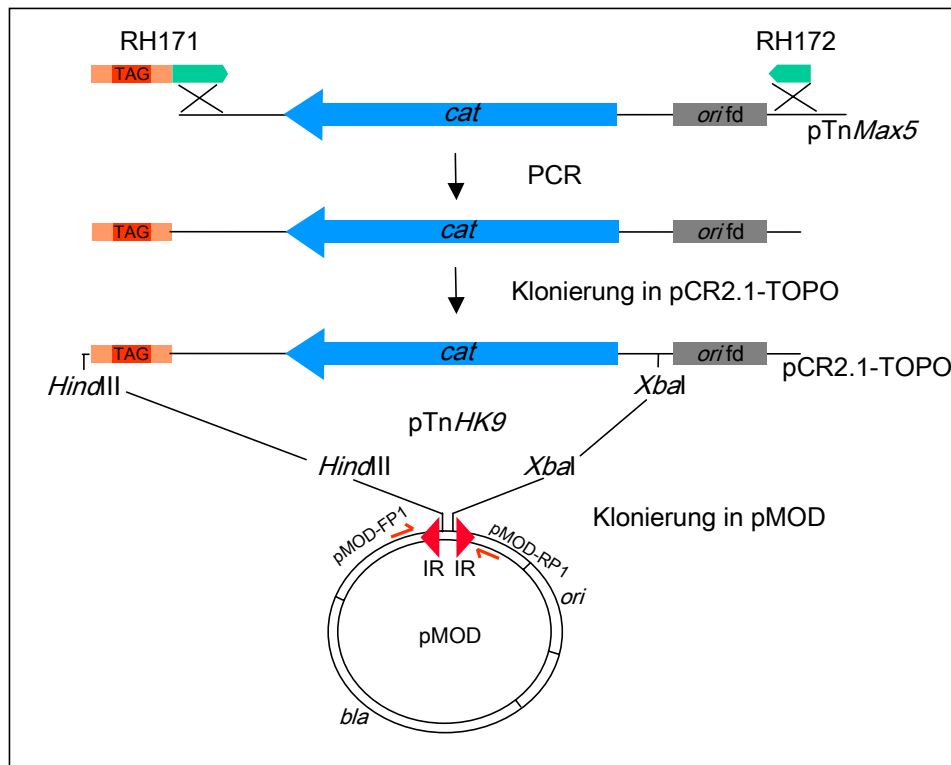


Abb. 5: Klonierungsstrategie zur Konstruktion von unterschiedlich signaturmarkierten Transposon-Plasmiden für die *in vitro*-Transposition.

Das Oligonukleotid RH171 wurde in dem angegebenen Signatur (TAG)-Bereich über eine Länge von 20 Bp zufällig generiert, wodurch sich eine Mischung von Oligonukleotiden ergab, die sich lediglich in diesem Bereich unterschieden. Der 3'-Bereich des Oligonukleotids ist homolog zu einem Bereich in der stromabwärts liegenden Region des *cat*-Gens im Plasmid pTnMax5. Mit diesem Plasmid als Matrize und den Oligonukleotiden RH171 und RH172 wurde ein 1250 Bp großes Fragment amplifiziert. Nach Restriktion des PCR-Produktes mit *Hind*III und *Xba*I wurde das resultierende 992 Bp-Fragment in den ebenfalls *Hind*III/*Xba*I-restringierten pMOD-Vektor kloniert, der für die *in vivo*-Transpositionsreaktion optimierte invertierte Sequenzwiederholungen (IR) besitzt.

3.1.5 Begrenzung und Auswahl der unterschiedlich signaturmarkierten TnHK9-Transposons

Aus der Menge an zufällig generierten signaturmarkierten Transposons sollte eine begrenzte, definierte Gruppe ausgewählt werden, die bei der Infektion eines Tieres eingesetzt wird. Bei der STM-Methode der simultanen Identifikation

kolonisierungsdefekter Mutanten muss die molekulare Signatur einer jeden Mutante im selben Tier unterschiedlich sein. In einem weiteren Infektionsexperiment in einem anderen Tier können hingegen die gleichen Signaturen verwendet werden.

Die Experimente zur Validierung des Wüstenrennmaus-Modells (siehe Kapitel 3.1.1) hatten gezeigt, dass sich kolonisierende Mutanten bei einer Infektion mit insgesamt 10 Mutanten pro Tier reproduzierbar detektieren ließen. Allerdings ließen sich 2 der Mutanten nur in 8 von 10 Tieren nachweisen. Das führte zu der Überlegung, die Anzahl der Mutanten pro Tier gegenüber anderen STM-Anwendungen deutlich zu reduzieren. Zudem zeigte sich in diesen Experimenten die Schwierigkeit, eine große Anzahl von *H. pylori*-Mutanten für die Infektion im gleichen Wachstumsstadium zu kultivieren. Daraus resultierend wurde eine Anzahl von 24 unterschiedlichen Mutanten pro Tier als geeigneter Kompromiss zwischen effektiver Suche und Reproduzierbarkeit der Daten angesehen. Die Anzahl der in der STM-Suche verwendeten Signaturmarken wurde daraufhin auf 24 beschränkt. Die Signaturmarken sollten möglichst variabel sein, keine signifikanten Homologien zu bekannten *H. pylori*-Genomsequenzen besitzen und in der Signatur-Detektions-PCR eindeutig und mit hoher Sensitivität zu detektieren sein.

Nach der Sequenzierung der Signatur-Region einer Reihe von unterschiedlichen TnHK9-Transposons wurden letztlich 24 ausgewählt, deren Signatur-Regionen variabel waren, keine Homologien zu bekannten *H. pylori*-Sequenzen aufwiesen und deren Hybridisierungstemperaturen in einem ähnlichen Bereich lagen (siehe Tabelle 8).

Aufgrund dieser Signatur-Sequenzen wurden die Signatur-Oligonukleotide entwickelt, die in der Detektions-PCR eingesetzt wurden. Dabei wurden die Oligonukleotide im Vergleich zur Signatur-Sequenz z.T. verkürzt oder in den konstanten Bereich des Transposons hinein verlängert. Damit wurde die Bildung von Haarnadelstrukturen verhindert, die Hybridisierungstemperatur weiter angeglichen, oder eine zu geringe Bindungsenergie bei der Duplexformation von Matrize und Oligonukleotid, speziell am 3'-Ende verhindert (siehe Kapitel 2.1.3).

Tabelle 8: Sequenzen der 24 in der STM-Suche eingesetzten Signaturmarken

Signatur Nr.	Signatur-Bezeichnung	Signatur-Sequenz 5'-3'	T _m [°C]
1	3	CAAACGCACTGAAATCTTTA	56
2	4	TAAACTGTAGTCTAGGTCTC	56
3	7	TTGGCAACCGGGTTGTTGCT	62
4	11	AATTCATTCTCGTGTTC	54
5	13	TCCAGGAACCCGGGCTGGTT	66
6	16	TTAGGGTGTATGCCTGCGG	62
7	17	GTCATCCCCCTTGCTCACCC	66
8	20	AAATCTTGTAATCAACTCT	50
9	21	ATTTGGGTCATCTTCGTGGA	58
10	22	CTTCGCGGGCTAGTAGTATG	62
11	26	AGCTTGGAGGGCTTGGCGCC	68
12	27	CAATACCGTTGCGGATGAAT	58
13	28	AGAAGTTTCAGCGGTCAGTA	58
14	30	ACCGATACATGATACGATGT	56
15	31	GCCATTGGACTTGAGCTCTG	62
16	41	GTATCATACGTGTTCCCTA	56
17	44	TGTTTCATGATTTGGTGAGAG	56
18	45	GAGAATGATTATTAGACTGA	52
19	47	GCTCACGACGGGCACTGTAC	66
20	48	ATAGTGATAGTCCATTTTAT	50
21	54	ATTTTCCGTGGATTTGTGT	54
22	62	AGTTTATAGTAACGAGTTAGT	52
23	63	AGTTCACAGGTAACCGGCTTG	62
24	64	GGTTTACTTAGCGATTGATT	54

Die Signatur-Bezeichnung bezieht sich auf die Nummerierung der Signaturen bei der Sequenzierung. Diese Bezeichnung wurde nach der Auswahl der in der STM-Suche eingesetzten Signaturen in eine durchgängige Bezeichnung der Signaturen übertragen.

3.1.5.1 Untersuchungen zur Sensitivität und Spezifität der Signatur-Oligonukleotide in der Signatur-Detektions-PCR

Vor der Verwendung der ausgewählten Signatur-Transposons war es notwendig, diese auf ihre Spezifität und auf die zu erreichende Sensitivität zu testen. Die Untersuchungen zur Spezifität wurden vor Beginn der Transposonmutagenese der *H. pylori*-Genbank zunächst mit den 24 unterschiedlichen Transposonplasmiden pTnHK9 (3-64) durchgeführt. Nach Erhalt

der *H. pylori*-Mutanten mit den entsprechenden Signaturen wurden die Tests zur Spezifität mit der chromosomalen DNA der unterschiedlich signaturmarkierten Mutanten wiederholt. Für die Beurteilung der Spezifität wurden 4 unterschiedliche Gemische chromosomaler DNA der 24 Mutanten mit jeweils der gleichen Konzentration hergestellt (50 ng/μl), um alle möglichen Kreuzreaktionen abzudecken:

1. Signaturen 1-12
2. Signaturen 13-24
3. Signaturen mit ungeraden Nummern
4. Signaturen mit geraden Nummern

Zur Detektions-PCR wurde in jedem Ansatz eines der 24 Signatur-Oligonukleotide sowie das konstante Oligonukleotid SO38 eingesetzt.

Unter den getesteten Bedingungen (siehe 2.7.3.2) wies kein Signatur-Oligonukleotid eine Kreuzhybridisierung mit einer anderen Signatur auf. In allen Fällen konnte die aufgrund des Matrizengemisches erwartete 896 Bp-Bande amplifiziert werden (siehe Abb. 6). Bei der Amplifikation von Signatur 7 ergaben sich neben der spezifischen Bande eine Reihe weiterer unspezifischer Banden, die allerdings nicht im Größenbereich der erwarteten Bande lagen. Dennoch ergaben sich später bei der Auswertung der STM-Suche bei Mutanten dieser Signatur teilweise nicht eindeutige Detektionsergebnisse. Diese Mutanten wurden in der Suche nicht berücksichtigt. In allen weiteren PCR-Ansätzen konnte unter diesen Bedingungen die Amplifikation der Signaturbande weitgehend frei von kreuzhybridisierenden, unspezifischen Banden anderer Größen erreicht werden.

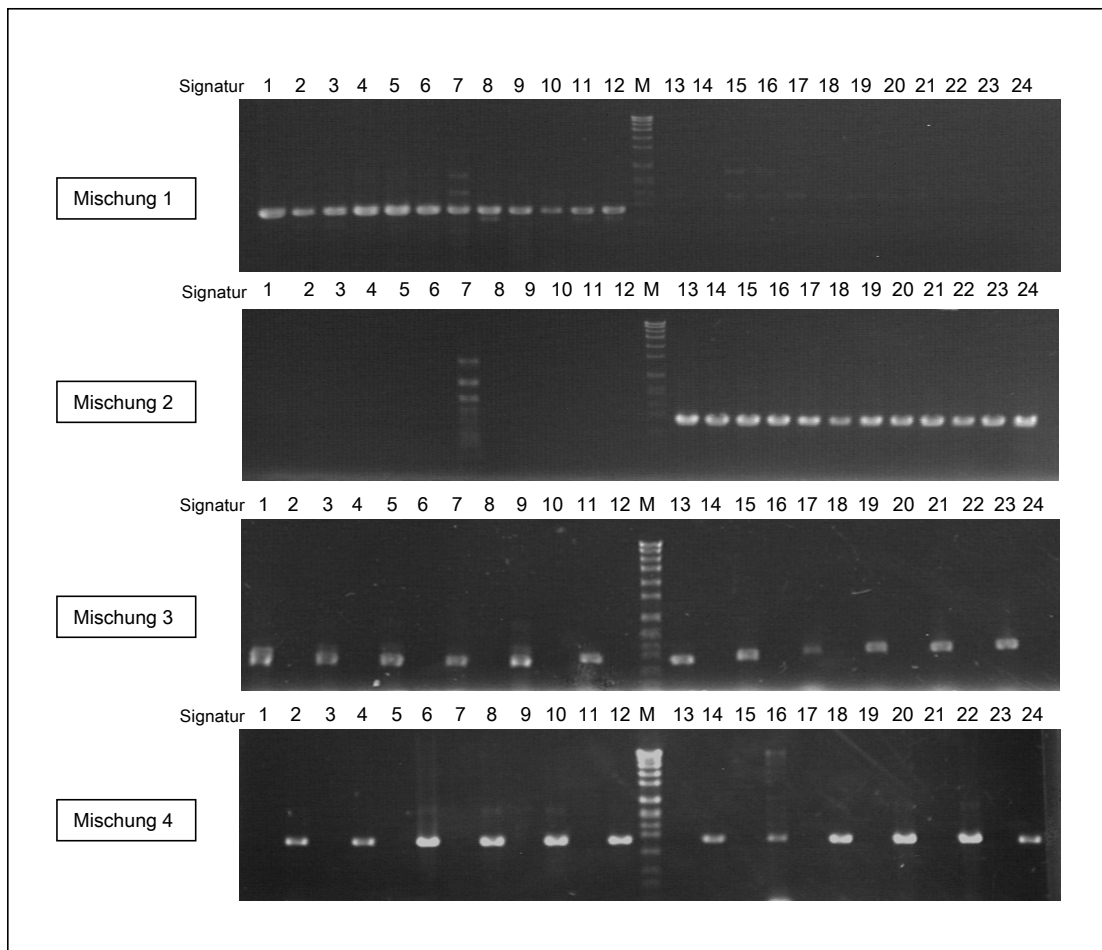


Abb. 6: Selektivität der verwendeten Signatur-Oligonukleotide in der Signatur-Detektions-PCR

Die Selektivität der molekularen Signaturen wurde getestet, indem aus der chromosomalen DNA 24 unterschiedlich signaturmarkierter Mutanten vier Mischungen hergestellt wurden, die als Matrice in der Signatur-PCR-Reaktion dienten. Mischung 1 enthielt die DNA mit den Signaturen 1-12, Mischung 2 enthielt 13-24, Mischung 3 alle ungeraden und Mischung 4 die DNA mit geraden Signaturnummern. Bei der PCR-Reaktion wurde jeweils jede der vier Matrizemischungen mit allen 24 Signatur-Oligonukleotiden als variables Oligonukleotid und dem Oligonukleotid SO38 als konstantem Oligonukleotid getestet. Die PCR-Ansätze wurden auf ein 1,5%-iges Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt. Der verwendete Längenstandard wurde mit M bezeichnet.

Da sich erwartungsgemäß das Verhältnis der Anzahl reisolierter *H. pylori*-Mutanten verschiedener molekularer Signaturen während der Infektion im Vergleich zum Infektionsgemisch, in dem alle Mutanten im gleichen Verhältnis enthalten sind, verändert, war es notwendig, die minimale DNA-Menge zu ermitteln, bei der sich noch alle Signaturen verlässlich detektieren ließen. Dazu wurde aus 24 *H. pylori*-Mutanten mit unterschiedlicher Signatur chromosomale DNA isoliert und in gleichen Konzentrationsverhältnissen gemischt

(Endkonzentration 50 ng/μl). Die Signatur-Detektions-PCR wurde wie bei der Untersuchung zur Selektivität durchgeführt. In mehreren Ansätzen wurde die als Matritze eingesetzte DNA-Lösung verdünnt und die Konzentration bestimmt, bei der sich bei allen 24 PCRs noch ein im Agarosegel sichtbares Amplifikat ergab (siehe Tabelle 9). Hieraus ergab sich, dass sich noch bei einer Konzentration der DNA-Lösung von 0,05 ng/μl alle Signaturen amplifizieren ließen. Bei einer DNA-Konzentration von 0,005 ng/μl hingegen wurden nur noch 9 der 24 Signaturen so amplifiziert, dass sie im Agarosegel noch als Banden zu erkennen waren. Pro Einzel-PCR wurden 0,3 μl der Matritzen-Lösung eingesetzt, die ein Gemisch aus chromosomaler DNA mit 24 Signaturen darstellte. Demnach wird eine DNA-Menge von 0,63 pg zur Detektion einer Signatur aus einem Gemisch von 24 signaturmarkierten chromosomalen DNA benötigt, was etwa der DNA-Menge von 5×10^5 Bakterien entspricht (bei einer Genomgröße von 1,6 MBp). Dieser Kalkulation nach müsste eine einzelne Mutante in einem Gemisch von 5000 Mutanten-Kolonien, die nach Reisolation vereinigt wurden, in der Signatur-PCR detektierbar sein.

Tabelle 9: Test zur Sensitivität der Signatur-Detektions-PCR

Matritzen-DNA	Signatur Nr.																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Unverdünnt	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
1:10	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
1:100	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
1:1000	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
1:10000		x									x	x	x	x	x						x	x	x	

Chromosomale DNA von 24 mit unterschiedlichen Signaturen markierten *H. pylori*-Mutanten wurde in gleichen Mengen gemischt (Endkonzentration 50 ng/μl). Diese Mischung diente als Matritze für 24 PCR-Reaktionen mit je dem entsprechenden Signatur-Oligonukleotid und SO38 als konstantes Oligonukleotid. Die Matritzen-DNA wurde verdünnt und erneut getestet, ob alle Signaturen detektierbar waren. Im Agarosegel noch sichtbare Signatur-PCR-Fragmente wurden in der Tabelle mit einem Kreuz gekennzeichnet.

3.1.6 Konstruktion einer *H. pylori*-Mutantengenbank mit molekularen Signaturen

3.1.6.1 Konstruktion einer *H. pylori*-Plasmidgenbank in *E. coli*

Zur Konstruktion einer *H. pylori*-Mutantengenbank wurde zunächst eine Plasmidgenbank aus chromosomalen DNA-Fragmenten aus dem *H. pylori*-Stamm P1 im Vektor pSO50 generiert. Dazu wurde chromosomale *H. pylori* P1-DNA partiell mit den Restriktionsenzymen *Hpa*II und *Sau*III A restringiert, und DNA-Fragmente mit einer Größe zwischen 4 und 7 kBb wurden über ein TAE-Agarosegel gereinigt. Diese Fragmente wurden mit dem ebenfalls *Bgl*II/*Cl*I restringierten Vektor pSO50 ligiert und in den *E. coli*-Stamm HB101 transformiert. 6630 unabhängige Klone wurden vereinigt, womit die erstellte Plasmidgenbank das *H. pylori*-Genom etwa 20-fach abdeckt. Nach:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1 - F \times G^{-1})}$$

N = Anzahl der Transformanten

P = Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein jedes beliebigen Genomabschnitts

F = durchschnittliche Fragmentgröße

G = Größe des Gesamtgenoms

(Sambrook *et al.*, 1989) beträgt die Wahrscheinlichkeit 99,99% (G=1,6 MBp), dass jeder Abschnitt des Genoms von *H. pylori* mindestens einmal kloniert wurde.

3.1.6.2 *In vitro*-Mutagenese der *H. pylori*-Genbank

Die Mutagenese der Genbank und die gleichzeitige Einführung der molekularen Signaturen erfolgte durch *in vitro*-Mutagenese im Reaktionsgefäß. Dazu wurde zunächst jedes der 24 unterschiedlich markierten TnHK9-Transposon-Derivate mittels PCR mit den Oligonukleotiden pMOD-FP1 und pMOD-RP1 vom entsprechenden pHK9-Transposonplasmid amplifiziert und gereinigt. Diese Linearisierung des Transposons war notwendig, um in der Transpositionsreaktion hohe Effizienzen zu erreichen (Goryshin und Reznikoff, 1998).

In der Reaktion wurden 200 ng Genbankplasmid mit einer äquimolaren Menge TnHK9-Transposon und 1 U Tn5-Transposase (Epicentre) im Reaktionspuffer vermischt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach der *in vitro*-Transposition wurde der gesamte Ansatz in *E. coli* DH5 α transformiert. Dieses Verfahren wurde mit allen 24 Transposonderivaten wiederholt. Nach der Transformation in *E. coli* DH5 α wurden die resultierenden Transformanten einer Transpositionsreaktion (112-5000 Klone) vereinigt (siehe Abb. 7).

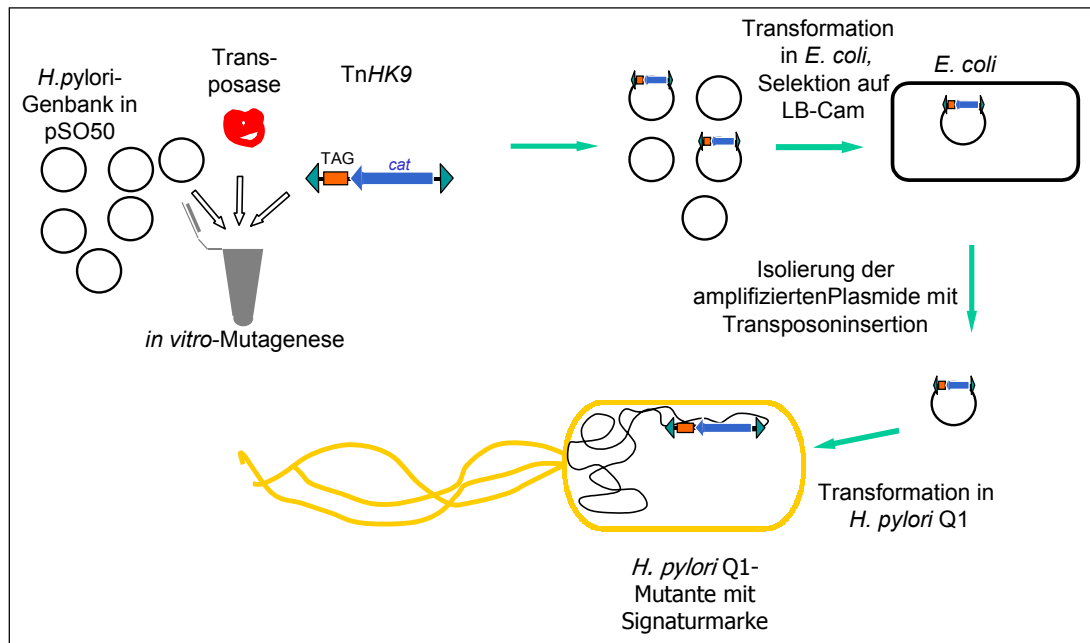


Abb. 7: Schema der *in vitro*-Mutagenese von *H. pylori*

Die *in vitro*-Mutagenese erfolgte in 24 Runden. In jeder Runde wurde die *H. pylori*-pSO50-Genbank mit EZ::TN-Transposase und dem TnHK9-Transposon einer molekularen Signatur (TAG) inkubiert. Zur Amplifikation der transponierten Plasmide wurde der gesamte Transpositionsansatz in *E. coli* DH5 α transformiert, auf LB-Cam selektioniert und die resultierenden Klone vereinigt. Von diesem Gemisch wurden Plasmide isoliert, die zur Transformation von *H. pylori* verwendet wurden.

Der an die Wüstenrennmaus adaptierte *H. pylori*-Stamm Q1 wurde mit den transposonmutagenisierten Genbankplasmiden je einer Signatur transformiert. Von jeder Signatur wurden 40 unabhängige Mutanten eingefroren, was einer Gesamtmutantenzahl von 960 entspricht (24x40). *H. pylori* besitzt etwa 1600 Gene, so dass die Anzahl der getesteten Mutanten maximal 60% aller Gene umfasst.

Um die Diversität der *H. pylori*-Mutanten zu testen und auszuschließen, dass es in einer großen Anzahl der Mutanten zu multiplen Transformationsereignissen gekommen war, wurden je 12 Mutanten von 4

Signaturgruppen im Southern-Blot analysiert. Dazu wurde die chromosomale DNA der Mutanten mit dem Restriktionsenzym *PvuII* verdaut und mit dem Transposon TnHK9 als Sonde analysiert (Abb. 8 zeigt 2 der Southern-Blots). Das Restriktionsenzym *PvuII* schneidet einmal innerhalb des Transposons TnHK9. Daraus resultierend liegen die 2 Abschnitte auf verschiedenen DNA-Fragmenten.

In fast allen Spuren in Abb. 8 wurden 2 Fragmente sichtbar, wobei die hybridisierenden Sequenzen auf verschieden großen DNA-Fragmenten liegen, was zeigt, dass die getesteten *H. pylori*-Mutanten einzelne TnHK9-Insertionen in unterschiedlichen Loci auf dem Chromosom besitzen.

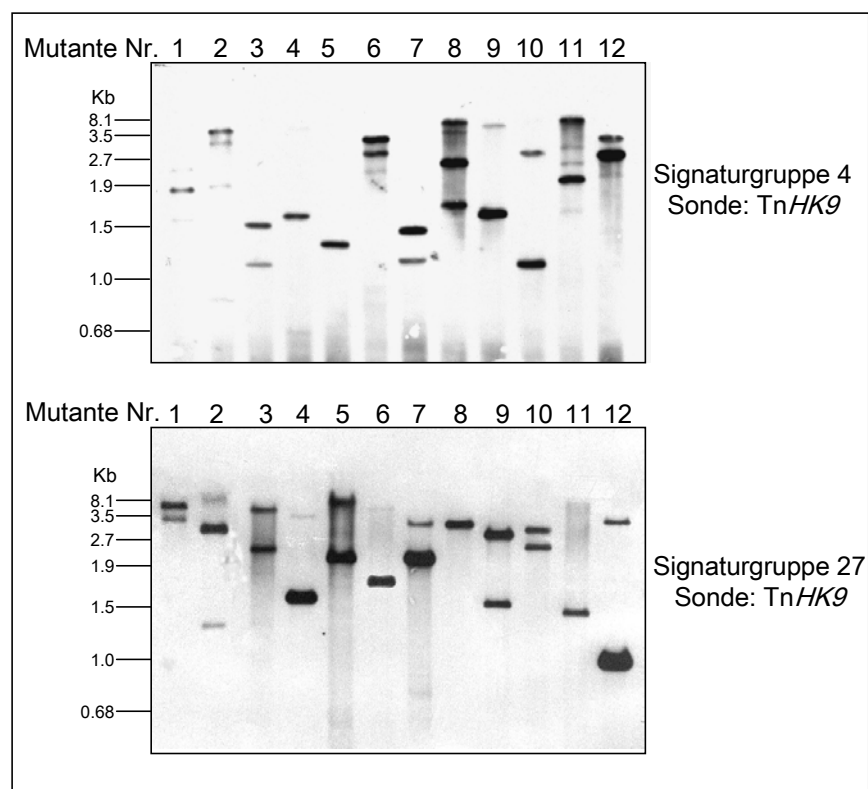


Abb. 8: Nachweis der Diversität der Transposoninsertionen innerhalb einer Signaturgruppe

Die chromosomale DNA von je 12 *H. pylori*-STM-Mutanten der Signaturgruppe 4 und 27 wurde vollständig mit dem Enzym *PvuII* geschnitten, auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Hybond N⁺-Membran transferiert und im Southern-Blot mit dem Transposon TnHK9 als Sonde analysiert. *PvuII* schneidet einmal im *cat*-Gen des Transposons, so dass bei der analysierten DNA 2 Fragmente detektiert wurden.

3.1.7 Besitzt das Transposon TnHK9 polare Effekte auf die Expression stromabwärts liegender Gene?

Bei bakteriellen Mutanten, die mittels Transposonmutagenese hergestellt werden, wird in vielen Fällen die Expression stromabwärts liegender Gene in der gleichen Transkriptionseinheit durch die Integration des Transposons beeinträchtigt. Diese sogenannten polaren Effekte des Transposons sind auf die Einführung von Terminationsstrukturen zurückzuführen, durch die die vollständige Transkription der polycistronischen mRNA nach der Transposoninsertionsstelle verhindert wird, oder liegen in der Reduktion der mRNA-Stabilität begründet.

Um zu überprüfen, ob bzw. bei welcher Insertionsrichtung das Transposon TnHK9 polare Effekte ausübt, wurde bei 5 *H. pylori*-Q1-Mutanten der Einfluss der Transposoninsertion auf die Expression stromabwärtsliegender Gene der gleichen Transkriptionseinheit untersucht.

Das Gen *trbB* (*hp1421*) ist zusammen mit den Genen *flil* (*hp1420*) und *fliQ* (*hp1419*) in einer Transkriptionseinheit organisiert (Porwollik *et al.*, 1999), deren Expression essentiell für die Motilität sind (Jenks *et al.*, 1997).

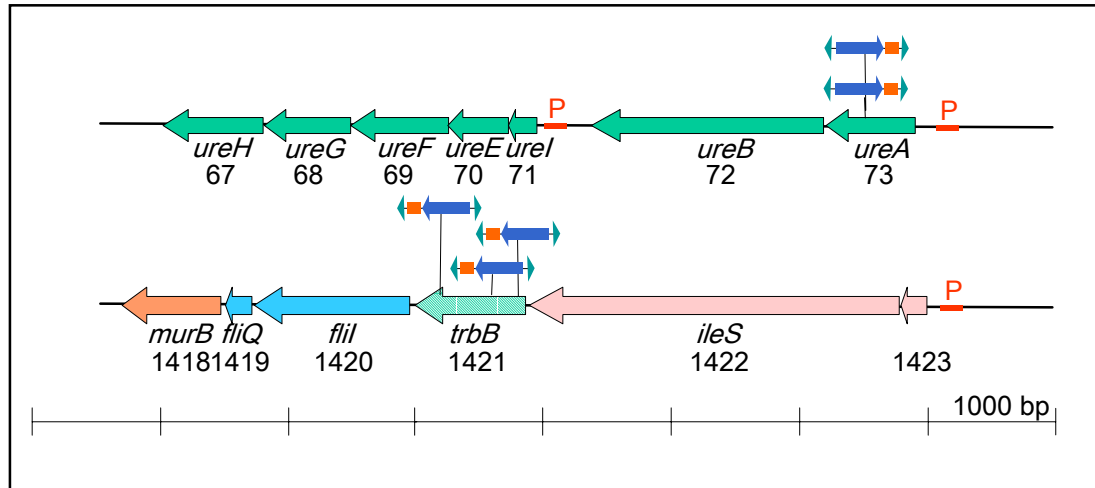


Abb. 9: Integration und Orientierung der Transposoninsertionen der untersuchten *H. pylori* Q1-Mutanten.

Die Abbildung zeigt die genetische Organisation und Operonstruktur des Urease-Genclusters (*hp0073-hp0067*) und des Flagellen-Export-Lokus (*hp1423-hp1418*) bei *H. pylori* 26695. Die Integration der TnHK9-Transposons der untersuchten Mutanten und die Orientierung der Transposons sind schematisch dargestellt. In der Transposondarstellung ist das *cat*-Gen in blau, die Signaturen in orange dargestellt. Promotorbereiche sind durch ein rotes P dargestellt.

Die Auswirkung einer Transposoninsertion in *hp1421* auf die Expression von *flil* und *fliQ* lässt sich in diesem Fall durch eine Untersuchung der Motilität der Mutanten testen (Abb. 9).

Drei unabhängige *H. pylori-trbB::TnHK9*-Mutanten mit Transposon-insertionen an den Positionen 20, 271 und 810 im *trbB*-Gen, bei denen das *cat*-Gen des Transposons in Transkriptions-Richtung des *trbB*-Gens lag (siehe Abb. 9), wiesen beim Test auf Motilität keinen Unterschied zum Wildtyp auf. Eine *flil*-Mutante war dagegen vollständig motilitätsdefekt (siehe Abb. 10). In diesem Fall bewirkt die Transposonintegration demnach keinen polaren Effekt, unabhängig von der Integrationsposition im Gen.

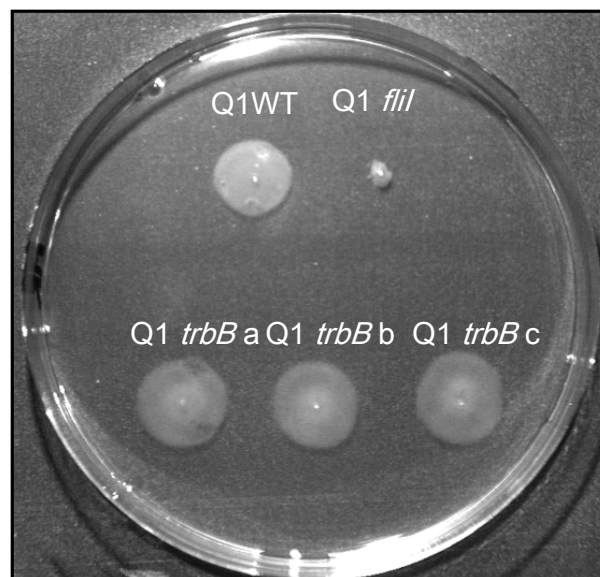


Abb. 10: Die Motilität von *H. pylori-trbB*-Mutanten ist nicht reduziert.

Drei unabhängige *H. pylori* Q1-Mutanten mit TnHK9-Transposoninsertionen im *trbB*-Gen an den Positionen 20 (a), 271 (b) und 810 (c) wurden mit einem sterilen Zahnstocher durch einen Einstich auf Weichagarplatten übertragen und für 3 Tage inkubiert. Als Kontrolle dient der motile *H. pylori* Q1 WT und eine motilitätsdefekte *H. pylori* Q1-*flil*-Mutante.

Das Urease-Gencluster besteht bei *H. pylori* aus den Genen *ureABIEFGH*, wobei *ureAB* für strukturelle Untereinheiten der Urease kodieren. *ureAB* und *ureIEFGH* bilden dabei jeweils eine Transkriptionseinheit (Akada *et al.*, 2000). Polare Effekte einer Transposoninsertion in *ureA* können somit durch Überprüfung der *ureB*-Expression in diesen Mutanten getestet werden.

Lysate zweier unabhängig erzeugter *ureA*-Mutanten mit gleicher Insertionsstelle (Position 533) und entgegengesetzter Transkriptionsrichtung des

cat-Gens im Transposon wurden auf die Expression von *ureB* im Western-Blot mit einem UreB-spezifischen Antikörper getestet. Während die zur Kontrolle aufgetragenen *ureI*- und *ureH*-Mutanten *ureB*-Expression zeigen, ist bei der als Negativkontrolle verwendeten *ureB*-Mutante kein UreB zu detektieren. Bei den untersuchten *ureA*-Mutanten lässt sich kein UreB durch den Blot nachweisen (siehe Abb. 11), die Insertion des Transposons in *ureA* hat in diesem Fall einen deutlichen polaren Effekt auf die *ureB*-Expression.

Die Versuche lassen den Schluss zu, dass der polare Effekt durch eine Insertion des *cat*-Gens entgegen der Transkriptionsrichtung der Transkriptionseinheit bewirkt wird.

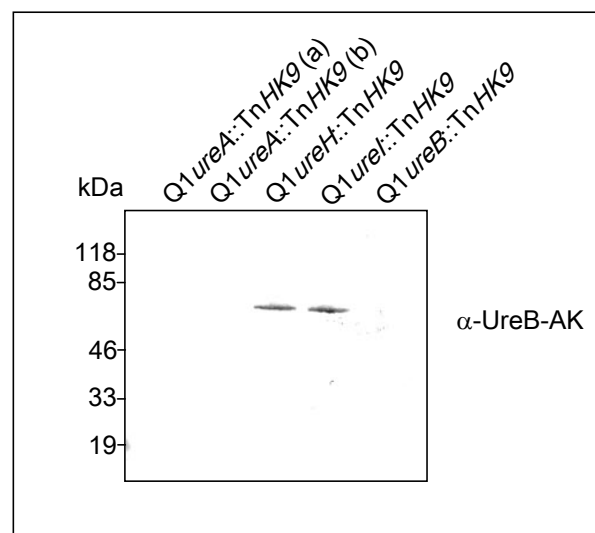


Abb. 11: TnHK9-Transposoninsertionen im *ureA*-Gen haben polare Effekte auf die Expression von *ureB*.

Die bakteriellen Lysate von zwei unabhängig generierten *H. pylori* Q1-Mutanten mit Transposoninsertionen im *ureA*-Gen an der Position 533 (a, b) wurden mit Lysaten von *H. pylori* *ureA*-, *ureI*- und *ureH*-Mutanten in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit einem anti-UreB-Antikörper auf die Expression von *ureB* untersucht.

3.1.8 Untersuchung der signaturmarkierten *H. pylori*-Mutanten auf Kolonisierungsfähigkeit im Magen von Wüstenrennmäusen

Die erzeugten 960 *H. pylori*-Mutanten sollten auf ihre Fähigkeit, den Magen von Wüstenrennmäusen zu kolonisieren, getestet werden. Dazu wurden je 24 Mutanten mit unterschiedlichen Signaturen simultan in einem Infektionsexperiment untersucht. Die Mutanten wurden zunächst auf Serumplatten inkubiert und in gleichen Verhältnissen in *Brucella*-Medium gemischt. Mit diesem Gemisch wurden zwei Wüstenrennmäuse oral mit einer Infektionsdosis von 10^9 Bakterien pro Tier infiziert. Parallel wurden die eingesetzten Mutanten einzeln weiterkultiviert, um an den zwei folgenden Tagen eine weitere Infektionsrunde durchführen zu können. Ein Teil des Gemisches vom 3. Infektionstag wurde zentrifugiert, und aus dem Bakteriensediment wurde chromosomale DNA als Eingangsgemisch-Matrize in der Signatur-Detektions-PCR verwendet. Es wurde hierfür das Gemisch des 3. Infektionstages verwendet, um sicherzustellen, dass die Tiere an jedem Infektionstag mit den im Eingangsgemisch vertretenen Mutanten infiziert wurden und die chromosomale DNA von Mutanten, die sich nicht weiterkultivieren ließen, nicht in der Eingangsgemisch-Matrizen-DNA enthalten ist. Dies war wichtig, da die simultane Kultivierung von 24 *H. pylori*-Mutanten, die sich in der gleichen Wachstumsphase befinden sollten, experimentell schwierig war.

21 Tage nach der letzten Infektion wurden die Tiere getötet, der Magen isoliert und kolonisierende *H. pylori*-Mutanten durch Plattieren des aus dem Magen gewonnenen Gewebekomogenats in geeigneten Verdünnungen reisoliert. Die reisolierten Bakterien aus den Mägen der zwei Tiere wurden zu getrennten Ausgangsgemischen vereinigt. Zum Nachweis der im Ausgangsgemisch vorhandenen *H. pylori*-Mutanten wurde chromosomale DNA von ca. 5000 reisolierten *H. pylori*-Mutanten isoliert und für die PCR zur Amplifikation der Signaturmarken eingesetzt.

Durch diese PCR konnten anhand des Vergleichs der Signaturbanden des Eingangs- mit denen des Ausgangsgemischs zweier Tiere diejenigen *H. pylori*-Mutanten identifiziert werden, die drei Wochen nach der Infektion den Wüstenrennmausmagen kolonisierten, und diejenigen, die kolonisierungsdefizient waren, bei denen also die Signaturmarke im Ausgangsgemisch fehlte (siehe Abb. 13). Erschien bei der Detektion einer Mutante nur bei einem der 2

Ausgangsgemische eine Bande, wurde diese Mutante als kolonisierend angesehen.

Auf diese Weise wurden alle 960 *H. pylori*-Mutanten auf ihre Fähigkeit, den Wüstenrennmausmagen zu kolonisieren, überprüft. Von den 960 getesteten Mutanten konnten in dieser ersten Suchrunde 548 Mutanten reisoliert werden (siehe Abb. 12). 364 Mutanten konnten hingegen nicht in den verschiedenen Ausgangsgemischen detektiert werden. Für insgesamt 48 Mutanten konnte keine Aussage über die Kolonisierungsfähigkeit *in vivo* getroffen werden. Diese Mutanten wiesen z.T. geringere Wachstumsraten als die anderen Mutanten derselben Signaturgruppe auf, oder es ergaben sich bei der PCR-Detektion der Signaturen keine eindeutigen Signale.

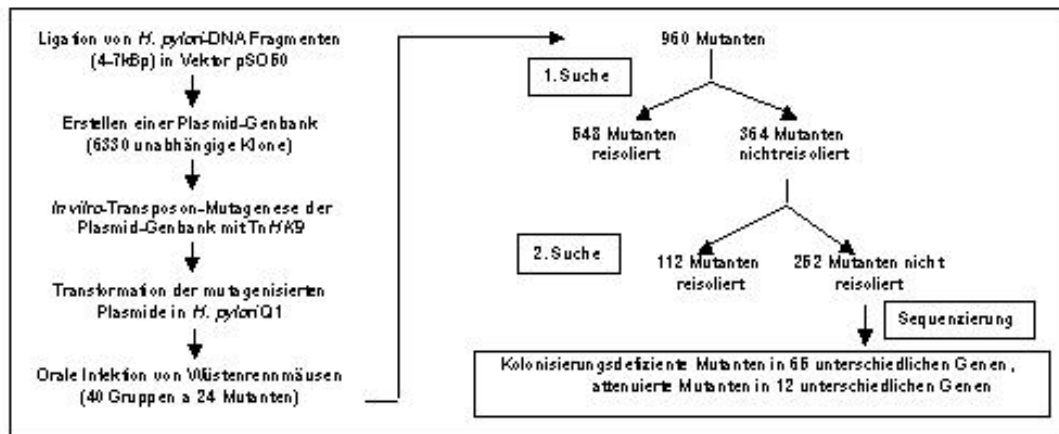


Abb. 12: Flussschema der Gesamtprozedur der STM-Suche nach *in vivo* essentiellen Genen von *H. pylori* im Wüstenrennmaus-Modell.

Die Abbildung umfasst die Schritte der Generierung einer repräsentativen Genbank, bis hin zur Anzahl der in den verschiedenen Infektionsrunden eingesetzten, reisolierten und nicht reisolierten Mutanten.

Wie schon beschrieben, war die simultane Kultivierung einer großen Anzahl von *H. pylori*-Mutanten in der annähernd gleichen Wachstumsphase experimentell aufwändig. Um auszuschließen, dass einige Mutanten aufgrund einer für die erfolgreiche Kolonisierung ungünstigen Wachstumsphase nicht kolonisierten, wurden die Mutanten, die in der ersten Untersuchungsrunde als kolonisierungsdefizient identifiziert wurden, in einer erneuten Infektionsrunde getestet.

Aus jeder der 40 Gemischgruppen wurden die nicht kolonisierenden Mutanten der ersten Runde zu neuen Eingangsgemischen vereinigt und erneut in zwei Tieren pro Eingangsgemisch untersucht. Diese neu zusammengestellten 40 Gruppen bestanden aus 4 bis 12 *H. pylori*-Mutanten. Durch die reduzierte Anzahl an Mutanten pro Tier wurde die Aussage der Untersuchung gesteigert, da der kompetitive Index (Anzahl einer Mutante/Gesamtzahl der Bakterien) bei der Infektion von 0,04 in der ersten Suche (24 Mutanten) auf 0,17-0,50 in der zweiten Suche erhöht wurde (4-12 Mutanten).

Nach erfolgter Reisolierung und PCR-Detektion der kolonisierenden Mutanten konnten 112 Mutanten identifiziert werden, die in dieser zweiten Suchrunde kolonisierten. 252 Mutanten kolonisierten weder in der ersten noch in der zweiten Suchrunde. Diese Mutanten wurden als kolonisierungsdefizient angesehen. Für die Untersuchung der Kolonisierungsfähigkeit der 960 Mutanten wurden so lediglich 80 Tiere benötigt.

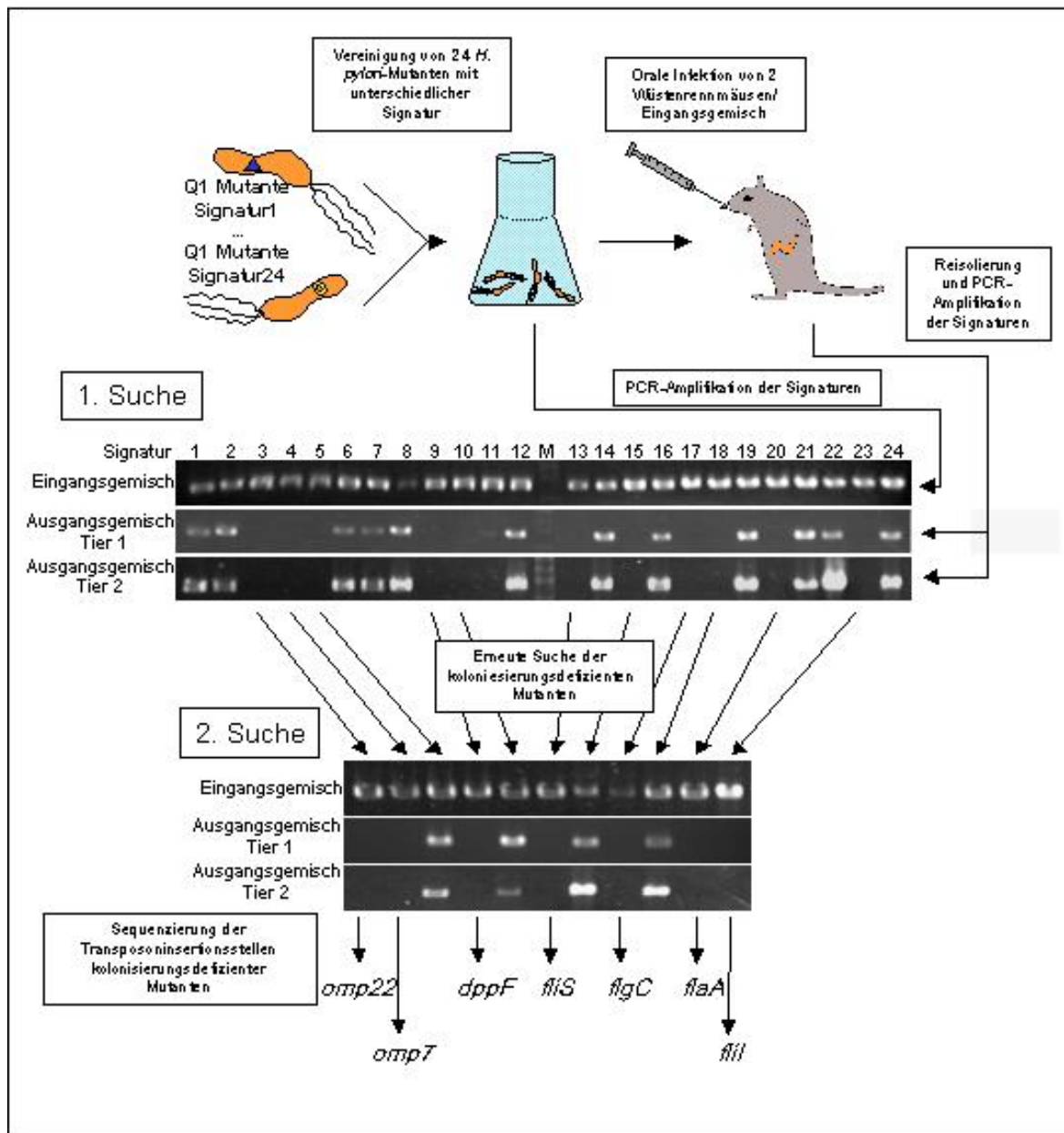


Abb. 13: Identifikation von *in vivo* essentiellen *H. pylori*-Genen.

Je 24 unterschiedlich signaturmarkierte *H. pylori*-STM-Mutanten wurden vereinigt und zur oralen Infektion von 2 Wüstenrennmäusen verwendet. 3 Wochen nach der Infektion wurden die kolonisierenden *H. pylori*-Mutanten aus dem Magen reisoliert und vereinigt. Die chromosomale DNA des Inokulumgemisches und des Mutantengemisches nach der Reisolierung wurde als Matrize in der Signatur-PCR-Reaktion eingesetzt. Aus dem Vergleich der PCR-Amplifikate des Inokulumgemisches mit denen der Gemische nach der Reisolierung lassen sich durch negative Selektion die Mutanten identifizieren, die im Wüstenrennmaus-Magen nach 3 Wochen nicht mehr kolonisieren. In einer zweiten Suchrunde wurden die Mutanten, die in der ersten Suchrunde nicht kolonisierten, erneut vereinigt und im Wüstenrennmaus-Modell auf ihre Fähigkeit zur Kolonisierung getestet. Zur Identifikation der Gene, die durch das Transposon TnHK9 inaktiviert wurden, wurde die Transposoninsertionsstelle der Mutanten, die auch in der zweiten Runde kolonisierungsdefekt waren, sequenziert und in Datenbanken abgeglichen. Die hier dargestellten Original-PCR-Daten stammen aus der Gemischgruppe 1 (von insgesamt 40 Gemischgruppen).

3.1.8.1 Identifikation von *in vivo* essentiellen Genen

Die Untersuchung von 960 *H. pylori*-Mutanten auf ihre Fähigkeit, den Magen von Wüstenrennmäusen zu kolonisieren ergab, dass 252 Mutanten nicht reisolierbar waren. Beim Rest der getesteten Mutanten hatte die Transposoninsertion keinen Einfluss auf die Kolonisierungsfähigkeit. Die Sequenzierung der Transposoninsertionsstellen aller kolonisierungsdefekter Mutanten sollte Aufschluss über die inaktivierten Gene geben. Hierzu wurde zunächst von allen Mutanten chromosomale DNA isoliert.

Bei der Sequenzierung der Transposoninsertionsstellen im Genom wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurde die chromosomale DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen partiell (*SauIII*A) oder vollständig (*HindIII*) verdaut und ohne vorherige Größenselektion der Fragmente mit dem Vektor pBA ligiert. Die Transformation erfolgte in *E. coli*-Zellen des Stammes Top10, der anders als die meisten *E. coli*-Klonierungsstämme das Methylierungsmuster von *H. pylori*-DNA toleriert. Durch Ausplattieren der Transformanten auf LB-Chloramphenicol-Platten wurde auf solche Klone selektioniert, die ein TnHK9-Transposon enthaltendes chromosomales Fragment im pBA Vektor trugen.

Die Sequenzierung der Transposoninsertionsstellen auf den Plasmiden erfolgte, ausgehend von bekannten Sequenzbereichen des TnHK9-Transposons, mit den Oligonukleotiden M13-FP, mit dem die Insertion des Transposons am 3'-Ende des *cat*-Gens bestimmt werden konnte, oder mit dem Oligonukleotid TnHK9_{out}, mit dem eine Sequenzierung vom 5'-Ende des *cat*-Gens in den transponierten chromosomalen Bereich möglich war. (Orientierung der Oligonukleotide siehe Abb. 14).

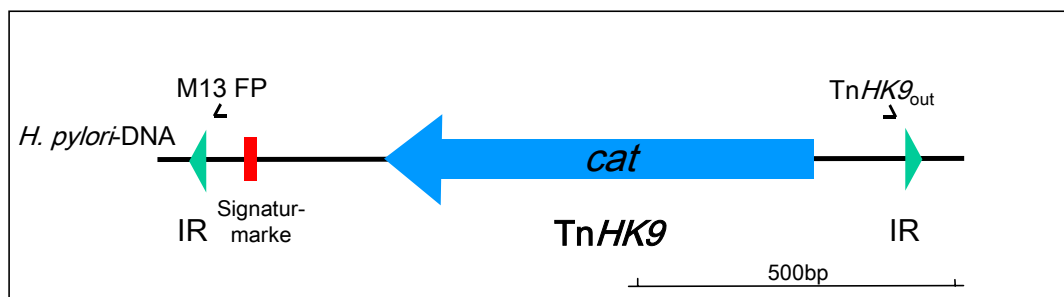


Abb. 14: Lage und Orientierung der zur Sequenzierung der Transposoninsertionsstellen verwendeten Oligonukleotide.

Zum anderen sollten Transposoninsertionen, die in einem Genabschnitt lagen, der in *E. coli* nicht klonierbar war, durch direkte Sequenzierung von chromosomaler

DNA identifiziert werden. Diese Sequenzierungen erfolgten mit dem M13-FP-Oligonukleotid.

Sowohl die eine als auch die andere Methode der Sequenzierung lieferte Sequenzergebnisse von ca. 500 Bp, inklusive ca. 40 Bp der bekannten Tn*HK9*-Sequenz, so dass der Übergang von den invertierten Sequenzwiederholungen des Tn*HK9*-Transposons zur transponierten Sequenz basengenau bestimmbar war. Die Sequenzen wurden unter Zuhilfenahme des BlastX-Algorithmus des NCBI-Servers (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) sowie der Suchprogramme der *H. pylori*-Genomsequenzierprogramme von *H. pylori* J99 (<http://scriabin.astrazeneca-boston.com>) und *H. pylori* 26695 (<http://www.tigr.org>) auf Sequenzähnlichkeiten untersucht. Durch diese Datenbankabgleiche konnten die Gene bzw. Genomabschnitte identifiziert werden, deren Inaktivierung im *H. pylori*-Stamm Q1 zu einem Kolonisierungsdefekt führte, oder aber keinen erkennbaren Einfluss auf die Kolonisierung hatten.

Die Sequenzierungen der chromosomalen DNA der 252 kolonisierungsdefizienten Mutanten ergab eine Anzahl von 77 unterschiedlichen Genen, die durch eine Tn*HK9*-Insertion getroffen waren. Darunter befanden sich 12 Gene, deren Mutanten als attenuiert bei der Kolonisierung angesehen wurden. Bei diesen Genen wurden Mutanten in der Gruppe der kolonisierenden und nicht kolonisierenden Mutanten gefunden (siehe 3.1.8.5). Die Mutanten mit Transposoninsertionen in identischen oder unterschiedlichen Positionen im gleichen Gen wurden zunächst einzeln bewertet und dann als attenuiert angesehen, wenn die Mehrzahl der Mutanten in diesem Gen nach der 2. Suche kolonisierungsdefizient waren.

Die durchschnittliche Redundanz der kolonisierungsdefekten Mutanten betrug 3,2, wobei einige Mutanten weit häufiger vorkamen als andere. So fanden sich in der Gruppe der 252 kolonisierungsdefekten Mutanten 19 *flgK*-, 19 *fliD*- und 19 *flaA*-Mutanten und 36 Mutanten, die nur einmal gefunden wurden.

Die als *in vivo* essentiell identifizierten Gene der STM-Suche lassen sich verschiedenen funktionellen Gruppen zuordnen (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: *In vivo* essentielle und attenuierende Gene von *H. pylori*

HP-ORF	JHP-ORF	Gene	Vorhergesagte Funktion
Motilität und Chemotaxis			
0601*	0548	<i>flaA</i>	Flagellin A
0295	0280	<i>flgL</i>	Haken-assoziiertes Protein 3
1558*	1466	<i>flgC</i>	Flagellen-Basal-Körper, Stab-Protein
0907*	0843	<i>flgD</i>	Flagellen-Haken-assemblierendes Protein
0870*	0804	<i>flgE</i>	Flagellen-Hakenprotein
1092	0333	<i>flgG</i>	Flagellen-Basal-Körper, Stab-Protein
0325*	0308	<i>flgH</i>	Flagellen Basal-Körper, L-Ring-Protein
1119*	1047	<i>flgK</i>	Flagellen-Haken-assoziiertes Protein 1
0752*	0689	<i>fliD</i>	Flagellen-Haken-assoziiertes Protein 2
0351*	0325	<i>fliF</i>	Flagellen-Basal-Körper, M-Ring-Protein
1420*	1315	<i>fliI</i>	Flagellen-Export-ATPase
0685	0625	<i>fliP</i>	Flagellen-Biosyntheseprotein
0753*	0690	<i>fliS</i>	Flagellenprotein
0797*	0733	<i>hpaA</i>	Flagellenscheidenadhäsion
0232*	0217		Sekretiertes, an Motilität beteiligtes Protein
1274*	1195	<i>pflA</i>	„paralysed flagella protein“
0392*	0989	<i>cheA</i>	Histidin Kinase
0393*	0988	<i>cheV</i>	Chemotaxis-Protein
Zellhülle und Proteine der äußeren Membran			
0360	1020	<i>galE</i>	UDP-Glukose-4-Epimerase
0366	1015		Sporenhüllpolysaccharid-Biosyntheseprotein C
0788	0126	<i>omp</i>	Äußeres Membranprotein
0486	0438	<i>omp</i>	Äußeres Membranprotein
0252* ^Δ	0237	<i>omp7</i>	Äußeres Membranprotein
0254*	0238	<i>omp8</i>	Äußeres Membranprotein
0923	0875	<i>omp22</i>	Äußeres Membranprotein
1177*	1103	<i>omp27</i>	Äußeres Membranprotein
Typ IV-Sekretions-Systeme und andere Transport-Systeme			
0017	0015	<i>comB4</i>	VirB4-Homolog, involviert in natürlicher Transformationskompetenz
1421*	1316	<i>trbB</i>	VirB11-Homolog
0055*	0047	<i>putP</i>	Prolin-Permease
0298* ^Δ	0283	<i>dppA</i>	Dipeptid-ABC-Transporter, peripl. Dipeptid-Bindeprotein
0302*	0287	<i>dppF</i>	Dipeptid-ABC-Transporter, ATP-Bindeprotein
1091*	0334	<i>kgtP</i>	Alpha-Ketoglutarat-Permease
0872	0806	<i>phnA</i>	Alkylphosphonat-Transporter

1082*	0343	<i>msbA</i>	Multiresistenz-Protein
1206	1129	<i>hetA</i>	Multiresistenz-Protein
1506*	1399	<i>gltS</i>	Glutamat-Permease
1576* ^A	1484		ABC-Transporter, ATP-Bindeprotein
Stress-Antwort und Säuretoleranz			
0073*	0068	<i>ureA</i>	Urease, Untereinheit A
0072*	0067	<i>ureB</i>	Urease, Untereinheit B (Harnstoff-Amidohydrolase)
0067*	0062	<i>ureH</i>	Urease, akzessorisches Protein
0071*	0066	<i>ureI</i>	Harnstoff-Permease
0210	0196	<i>htpG</i>	Chaperon und Hitzeschockprotein C62.5
0875* ^A	0809	<i>katA</i>	Katalase
Regulation			
0714	0652	<i>rpoN</i>	RNA-Polymerase-Sigma-Faktor 54
0930*	0865	<i>surE</i>	“stationary-phase survival protein”
Zentraler Stoffwechsel und Aminosäure-Biosynthese			
0237*	0222	<i>hemC</i>	Porphobilinogen-Deaminase
0416 ^A	0968	<i>cfa</i>	Zyclopropan-Fettsäure-Synthase
1186 ^A	1112		Carboanhydrase
0397*	0984	<i>serA</i>	Phosphoglyzerat-Dehydrogenase
Protein-Degradation			
0169*	0155	<i>prtC</i>	Kollagenase
VacA paraloge Proteine			
0289*	0247		VacA-Paralog
0922*	0856		VacA-Paralog
DNA-Rekombination und Reparatur			
0153* ^A	0141	<i>recA</i>	Rekombinase A
Hypothetische Proteine			
0018* ^A	0016		hp
0036* ^A	0032		hp
0217	0203		hp
0245*	0230		hp
0288*	0273		hp
0304* ^A	0289		hp
0350*	0324		hp
0367* ^A	1014		hp
0368*	1013		hp
0754* ^A	0691		hp

1250*	1171		hp
1359*	1277		hp
1440*	1333		hp
1454	1347		hp
1525	1414		hp
0758*	0695		chimp
1175*	1102		chimp
1184*	1110		chimp
1363*	1281		chimp
1486*	1379		chimp
1487* ^Δ	1380		chimp

*Transposoninsertion bewirkt möglicherweise polaren Effekt

^ΔMutanten mit attenuiertem Phänotyp; Mutanten mit Transposoninsertionen in identischen oder unterschiedlichen Positionen im gleichen Gen wurden zunächst einzeln bewertet und als attenuiert angesehen, wenn die Mehrzahl der Mutanten nach der 2. Suche kolonisierungsdefizient waren.

HP: Orf des Stammes *H. pylori* 26695 (Tomb *et al.*, 1997)

JHP: Orf des Stammes *H. pylori* J99 (Alm *et al.*, 1999)

hp: Hypothetisches Protein

chimp: Konserviertes hypothetisches integrales Membranprotein

chsp: Konserviertes hypothetisches sekretiertes Protein

3.1.8.2 Signifikanz der Daten der STM-Suche nach *in vivo* essentiellen Genen bei *H. pylori*

Mit der Suche nach *in vivo* essentiellen Genen bei *H. pylori* konnten einige der Gene identifiziert werden, deren Beteiligung am Kolonisierungsprozess schon vorher bekannt war, was die Methode von Seite der tatsächlich essentiellen Gene her validiert. Es stellte sich dennoch die Frage nach der Signifikanz der Gene für die Beteiligung an der Kolonisierung, die bisher nicht als *in vivo* essentiell bekannt waren.

3.1.8.3 Bestimmung der kompetitiven Indices (KI) einiger STM-Mutanten

Um zu ermitteln, welchen Grad der Attenuation die als kolonisierungsdefizient charakterisierten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp aufweisen, wurde für einige Mutanten, die Insertionen in Genen aus verschiedenen funktionellen Gruppen besaßen, der kompetitive Index (KI) bestimmt.

Dazu wurden die Mutanten im Verhältnis 1:1 mit dem Wildtyp gemischt und je eine Wüstenrennmaus oral mit einem Inokulum von 10^9 -Bakterien infiziert. Nach dreiwöchiger Inkubationszeit wurden Aliquots des Homogenats des Magens auf

Serumplatten mit Streptomycin zur Ermittlung der Zellzahl der Gesamtheit der infizierenden Bakterien ausplattiert. Durch Ausplattieren auf Serumplatten mit zusätzlicher Chloramphenicol-Zugabe wurde der Anteil der Mutanten daran ermittelt. In gleicher Weise wurde vorher mit dem Inokulum verfahren. Der kompetitive Index wurde folgendermaßen berechnet:

$$KI = \frac{\text{cfu Mutante (Reisolat)}}{\text{cfu Wildtyp}} / \frac{\text{cfu Mutante (Inokulum)}}{\text{cfu Wildtyp}}$$

Tabelle 11: Bestimmung der kompetitiven Indices einiger Mutanten

Mutante	HP-Orf	Gen	KI
3/8	17	<i>comB4</i>	<0,0010
26/36	55	<i>putP</i>	<0,0006
45/31	169	<i>prtC</i>	0,0123
22/3	245		<0,0160
64/29	289	<i>vacA</i> -Paralog	<0,0003
21/1	302	<i>dppF</i>	<0,0100
21/32	486	<i>omp</i>	<0,0025
21/29	685	<i>fliP</i>	<0,0149
4/8	758		<0,0026
22/4	788	<i>omp</i>	<0,0033
16/6	930	<i>surE</i>	<0,0032
62/22	973		<0,0009
54/30	1206	<i>hetA</i>	<0,0016
11/19	1421	<i>trbB</i>	<0,0075

Bei den untersuchten Mutanten ist die Signatur und die Nummer innerhalb der Signaturgruppe angegeben.

Ein KI-Wert über 1 bedeutet, dass sich die Mutante gegenüber dem Wildtyp durchgesetzt hat. Werte unter 1 demonstrieren den Grad der Attenuation der Mutante. Ein KI-Wert von 0 bedeutet, dass die Mutante nicht reisoliert werden konnte. Wie in Tabelle 11 dargestellt, weisen alle Mutanten einen gegenüber dem Wildtyp stark attenuierten Phänotyp auf. Im Competitionsexperiment konnte von allen untersuchten Mutanten der verschiedenen Gruppen lediglich die *prtC*-Mutante reisoliert werden, allerdings ist auch diese Mutante mit einem KI-Wert von 0,0123 stark in ihrer Kolonisierungsfähigkeit eingeschränkt.

Diese Daten zur Konkurrenz verschiedener Mutanten mit dem Wildtyp validieren die Suchkriterien der Gesamtsuche.

3.1.8.4 Untersuchungen zur Motilität und Ureaseaktivität von *H. pylori*-STM-Mutanten

H. pylori-Stämme zeichnen sich durch eine besonders hohe genetische Diversität aus, die auf hohe Mutations- und Rekombinationsraten zurückzuführen ist (Blaser und Berg, 2001). Für die Ureaseaktivität und die Motilität sind viele Gene verantwortlich, die etwa 3% des Gesamtgenoms von *H. pylori* ausmachen. Es war anzunehmen, dass einige der als kolonisierungsdefizient angesehenen Mutanten Sekundärmutationen in diesen Genen aufweisen.

Um dies zu überprüfen, wurden je eine oder mehrere Mutanten, die eine Transposon-Insertion in einem Gen besitzen, das als für die Kolonisierung essentiell identifiziert wurde, auf ihre Motilitätseigenschaften und auf Urease-Aktivität getestet. Die Motilität wurde getestet, indem eine Mutante durch einen Stich auf eine Weichagarplatte transferiert wurde. Drei Tage danach wurde die Koloniegröße gemessen und mit der Größe einer ebenfalls auf die Platte aufgetragenen *flaA*-Mutante als Negativ- und des *H. pylori*-Stamms Q1 als Positivkontrolle verglichen. Der Test auf Ureaseaktivität erfolgte lediglich qualitativ, indem Zellmaterial von einer Agarplatte abgenommen und in Urease-Testmedium resuspendiert wurde. Bei positiver Reaktion kam es innerhalb weniger Sekunden zu einem Farbumschlag des Indikators von Rosa nach Rot. Eine geringfügig niedrigere Ureaseaktivität, wie sie bei *ureI*-Mutanten zu beobachten ist (Skouloubris *et al.*, 1998), ließ sich mit dieser Methode allerdings nicht detektieren.

Die überwiegende Zahl der Mutanten in diesen Tests wiesen die vorhergesagten Aktivitäten auf. Damit konnte gezeigt werden, dass in diesen Mutanten keine Sekundärmutationen in Genen, die die Ureaseaktivität oder Motilität betreffen, für den Kolonisierungsdefekt verantwortlich sind. Einige Mutanten zeigten allerdings ein überraschendes Ergebnis (Ergebnisse der Tests siehe 7.1). So deuten die untereinander unterschiedlichen Motilitätseigenschaften zweier *ureH*-Mutanten (45/17 und 48/7) darauf hin, dass möglicherweise Sekundärmutationen in den Flagellengenen während der Erstellung der Mutantenbank vorkamen. Es ist ebenfalls anzunehmen, dass der beobachtete Motilitätsdefekt und nicht die Funktion des Alkylphosphonat-Transporters der

Grund für die beobachtete Attenuierung der *phnA*-Mutante ist. Einige weitere Mutanten in hypothetischen Gene (*hp0139*, *hp0245*) wiesen ebenfalls einen Motilitätsdefekt auf. Es bleibt zu testen, ob es sich bei den kodierten Genprodukten möglicherweise um noch nicht identifizierte strukturelle oder regulatorische Komponenten des Flagellenapparats handelt.

3.1.8.5 Identifikation *in vivo* nicht essentieller Gene von *H. pylori*

Durch die STM-Suche wurden neben den essentiellen auch solche Gene identifiziert, deren Inaktivierung zu keinem Kolonisierungsdefekt nach 3 wöchiger Inkubation führte. Von den 660 Mutanten, die in dieser Gruppe identifiziert wurden, wurden 195 hinsichtlich ihrer Tn*HK9*-Insertionsstellen sequenziert, um die Suchkriterien zu validieren. Unter diesen fanden sich Insertionen in 73 unterschiedlichen Genen. Die Verteilung der Insertionen des Tn*HK9*-Transposons war hier noch uneinheitlicher als in der Gruppe der essentiellen Gene. So wurden 75 Mutanten identifiziert, die eine Transposoninsertion im 23s-rRNA-Gen von *H. pylori* besitzen. Die Insertionsstellen lagen innerhalb dieser Mutanten in 53 unterschiedlichen Stellen, die das Gen und den Promotorbereich nahezu vollständig und zufällig abdecken. Dies spricht dafür, dass das Transposon keine bevorzugte Integrationsstellen besitzt.

Tabelle 12: *In vivo* nicht essentielle Gene von *H. pylori*

HP-ORF	JHP-ORF	Gene	Vorhergesagte Funktion
Zentraler Stoffwechsel			
0056	0048		Delta-1-Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase
0096	0088		Phosphoglycerat-Dehydrogenase
0196*	0182	<i>lpxD</i>	UDP-3-O-(3-Hydroxymyrisoyl)-Glukosamin N-Acyltransferase
0405*	0976		Aminotransferase
0407*	0974	<i>bisC</i>	Biotin Sulfoxid-Reduktase
0690	0938	<i>fadA</i>	Acetyl-Coenzyme A-Acetyltransferase
0755*	0692	<i>moeB</i>	Molybdopterin-Biosyntheseprotein
0798	0734	<i>moaC</i>	Molybdän-Cofactor-Biosyntheseprotein C
0799*	0735	<i>mog</i>	Molybdopterin-Biosyntheseprotein
0871	0805	<i>cdh</i>	CDP-Diglyzeridhydrolase
1222*	1143	<i>dld</i>	D-Laktat-Dehydrogenase
1281*	1202	<i>trpD</i>	Anthranilat-Synthase-Komponente II
1485*	1378	<i>pepQ</i>	Aminopeptidase

Zellhülle und Proteine der äußeren Membran

0472	0424	<i>omp11</i>	Äußeres Membranprotein
0638	0581	<i>oipA</i>	Äußeres Membranprotein
0671	0614	<i>omp14</i>	Äußeres Membranprotein
1395*	1432	<i>omp30</i>	Äußeres Membranprotein

DNA-Modifikation

0142	0130	<i>mutY</i>	A/G-spezifische Adenin-Glykosylase
0259	0243	<i>xseA</i>	Exonuklease VII, große Untereinheit
0585*	0532	<i>nth</i>	Endonuklease III
0602*	0549		Endonuklease III
0717*	0655	<i>dnaX</i>	DNA-Polymerase III, Gamma und Tau Untereinheit (intergene Region)
0827	0766		Einzelstrang-DNA-bindendes Protein, 12 RNP2-Vorläufer
0846*	0784	<i>hsdR</i>	Typ I-Restriktionsenzym, R-Protein
1471*	1364		Putatives Typ II-Restriktionsenzym

Transport

0475	0427	<i>modD</i>	Molybdän-ABC-Transporter, ATP-Bindeprotein
0497*	0449		Natrium- und Chlorid-abhängiger Transporter
1251*	1172	<i>oppB</i>	Oligopeptid-ABC-Transporter, Permease

Energiestoffwechsel

0047	0040	<i>hypE</i>	Hydrogenase-Expressions/Formations-Protein
0633*	0576	<i>hydC</i>	Hydrogenase-Cytochrom b-Untereinheit

Virulenzassoziierte Proteine

0404*	0977	<i>SP: P16436</i>	Protein C-Kinase-Inhibitor
0610	0556	<i>vacA</i> -Paralog	Vakuolisierendes Zytotoxin A-Paralog
0887	0819	<i>vacA</i>	Vakuolisierendes Zytotoxin A
1248*	1169	<i>vacB</i>	Virulenzassoziiertes Protein-Homolog

Translation

		<i>rrnA</i> 23s	23s rRNA B-Gen
--	--	-----------------	----------------

Chemotaxis

0103*	0095	<i>trbB</i>	"Methyl-Accepting" Chemotaxis-Protein
-------	------	-------------	---------------------------------------

Hypothetische Proteine

0080	0074		hp
0087*	0080		hp

0094*	0086		chp
0138*	0126		chisp
0139*	0127		chsp
0235	0220		chsp
0304	0289		hp
0318	0301		chp
0374	1007		chp
0495	0447		hp
0635	0578		hp
0654*	0599		chp
0718*	0656		chimp
0762*	0699		hp
0781*	0718		hp
0783	0720		hp
0803*	0739		hp
0810*	0746		chp
0851	0787		chimp
0874*	0808		hp
0884*	0816		hp
0914	0850		hp
0926*	0860		chp
0964*	0898		hp
0971*	0905		hp
1089*	0336		hp
1106	1033		hp
1162*	1089		chimp
1184*	1110		chimp
1225	1133		chimp
1333	1253		hp
1353	1272		hp
1457*	1350		hp
1488*	1381		chsp
1588	1494		chp

*Transposon-Insertion bewirkt möglicherweise polaren Effekt

HP: Orf des Stammes *H. pylori* 26695 (Tomb *et al.*, 1997)

JHP: Orf des Stammes *H. pylori* J99 (Alm *et al.*, 1999)

hp: Hypothetisches Protein

chimp: Konserviertes hypothetisches integrales Membranprotein

chp: Konserviertes hypothetisches Protein

chsp: Konserviertes hypothetisches sekretiertes Protein

3.1.8.6 Untersuchung zur Häufigkeit falsch klassifizierter Gene in der STM-Suche

Die Genregion, die die 23s-rRNA kodiert, liegt in allen daraufhin untersuchten *H. pylori*-Stämmen in zwei nahezu identischen Kopien im Chromosom vor (Bukanov und Berg, 1994). Bei der Suche nach *in vivo* essentiellen Genen bei *H. pylori* wurden insgesamt 75 Mutanten identifiziert, die eine TnHK9-Transposoninsertion im 23s-rRNA-Gen oder in deren Promotorbereich besaßen. Aufgrund der Häufung dieser Mutanten in der STM-Suche lassen sich anhand dieser Mutanten und ihrer Klassifizierung in essentiell bzw. nicht essentiell für die Kolonisierung Aussagen über die Signifikanz der gewonnenen Daten der STM-Suche insgesamt machen. Abb. 15 zeigt die Einteilung der Mutanten in den zwei durchgeführten STM-Suchen. 73,3% der Mutanten wurden bereits in der 1. Suche als kolonisierend identifiziert und 20% in der zweiten Suche. 6,7% der 23s-rRNA-B-Mutanten wurden als kolonisierungsdefizient eingestuft. Aus den Daten lässt sich sicher schließen, dass eine Transposoninsertion in diesem DNA-Abschnitt keine Auswirkungen auf die Kolonisierungsfähigkeit hat.

Insgesamt sind die Selektionskriterien in der Gesamtsuche durch die zwei durchgeführten Suchrunden so gewählt, dass es bei verschiedenen Mutanten im gleichen Gen zu 93,3% Übereinstimmung bei der Bewertung der Notwendigkeit *in vivo* kommt. Durch die Daten wird zudem deutlich, dass die zweite Suchrunde für die Bestimmung der Essentialität *in vivo* notwendig war, denn hier wurden noch 20% der 23s rRNA-B-Mutanten als kolonisierend identifiziert, die in der ersten Suche noch nicht detektiert wurden.

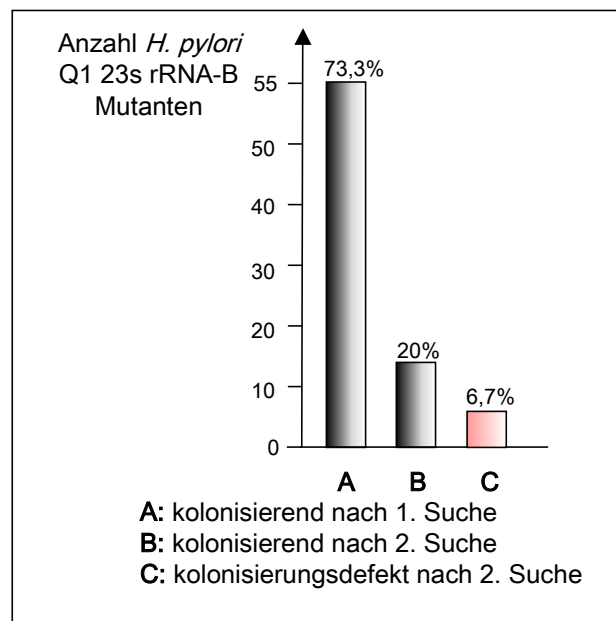


Abb. 15: Anzahl der kolonisierenden und kolonisierungsdefizienten *H. pylori* Q1-23s rRNA-Mutanten nach unterschiedlichen STM-Suchrunden.

Von den insgesamt 75 in der STM-Suche identifizierten 23s rRNA B-Mutanten wurde die Anzahl bestimmt, die nach der ersten bzw. zweiten Suchrunde als kolonisierend *in vivo* identifiziert wurden. Diese Mutanten wurden in der Abbildung den Mutanten gegenübergestellt, die nach der 2. Suche als kolonisierungsdefekt angesehen wurden.

3.1.9 Einfluss des Eisenspeicherproteins Pfr und der adhäsionsassoziierten äußeren Membranproteine AlpA und AlpB auf die Kolonisierungs-fähigkeit *in vivo*

Obwohl durch den randomisierten STM-Ansatz die Frage nach der Notwendigkeit im Infektionsprozess für eine große Anzahl von Genprodukten von *H. pylori* geklärt werden konnte, blieb die Frage für andere Gene, deren Genprodukte durch *in vitro*-Versuche einen Zusammenhang mit der Kolonisierungsfähigkeit *in vivo* vermuten ließen, weiter offen.

Von besonderem Interesse war dabei das *pfr*-Gen, dessen Genprodukt als Eisenspeicherprotein beschrieben worden ist und eine zentrale Rolle im Eisenhaushalt von *H. pylori* spielt (Frazier *et al.*, 1993). Des Weiteren sollte die Rolle der an der Adhärenz von *H. pylori* an Kato III-Zellen beteiligten äußeren Membranproteine AlpA und AlpB im Infektionsprozess untersucht werden (Odenbreit *et al.*, 1999). Um unspezifische, durch die chromosomale Integration des *cat*-Gens in das Chromosom bei der Generierung der Mutanten bedingte

Effekte auszuschließen, wurde ebenfalls eine isogene Mutante im Cytotoxin assoziierten Gen *cagA* hergestellt, die als Positivkontrolle im Infektionsexperiment dienen sollte. Eine *H. pylori cagA*-Mutante hat keinen Einfluss auf die Kolonisierungsfähigkeit im Magen von Wüstenrennmäusen (Wirth *et al.*, 1998).

Die Mutanten wurden in dem Wüstenrennmaus-adaptierten *H. pylori*-Stamm Q1 durch Transformation mit den Suizidplasmiden pMU140a (*alpAB*), pWS30 (*cagA*) und pPFR1-CAT (*pfr*) erzeugt. Die erhaltenen Mutanten wurden im Western-Blot auf die Expression von *cagA*, *alpA*, *alpB* und *pfr* untersucht. Der Genaustausch über homologe Rekombination erfolgte bei allen Mutanten in gewünschter Weise. Es konnte keine Expression des jeweils mutagenisierten Gens detektiert werden (siehe Abb. 16).

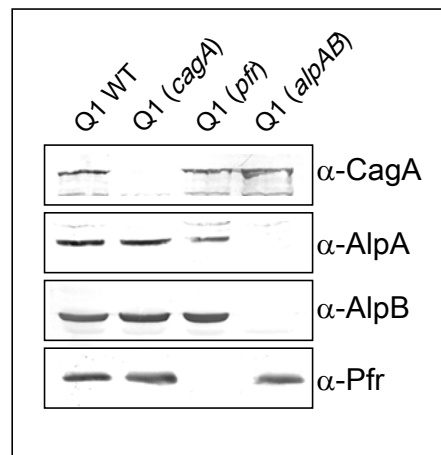


Abb. 16: Überprüfung der im Infektionsexperiment eingesetzten *H. pylori* Q1-Mutanten durch Immunoblot.

Bakterielle Lysate der erhaltenen *H. pylori* Q1-*cagA*-, -*pfr*- und -*alpAB*-Mutanten wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit den Antikörpern anti-CagA, anti-AlpA, anti-AlpB und anti-Pfr im Western-Blot analysiert.

Bei den Infektionsexperimenten wurden jeweils 3 Tiere mit einer Mutante oral infiziert. Wie bei den vorangegangenen Experimenten betrug das Inokulum 10^9 Bakterien pro Tier. Die Reisolierung erfolgte nach 3, bei einer Wiederholung des Versuchs nach 6 Wochen. Während die Mägen der Tiere, die mit dem *H. pylori*-Wildtyp und der *cagA*-Mutante infiziert waren, nach 3 Wochen eine vergleichbare bakterielle Beladung aufwiesen ($1,0 \times 10^5$ und $1,2 \times 10^5$), konnte die *pfr*-Mutante weder nach 3 noch nach 6 Wochen reisoliert werden (Abb. 17). Die *alpAB*-Mutante zeigte nach 3 ($1,9 \times 10^4$) und auch nach 6 Wochen ($3,7 \times 10^4$) eine

geringere Kolonisierungsfähigkeit im Verhältnis zum WT ($8,8 \times 10^4$) und zur *cagA*-Mutante ($1,2 \times 10^5$), die nach beiden Zeitpunkten sogar effizienter als der Wildtyp kolonisierte. Die Versuche weisen zum ersten Mal auf die Notwendigkeit der Eisenregulation von *H. pylori* im Magen hin. Dagegen deutet die nur leicht in ihrer Kolonisierungsfähigkeit reduzierte *alpAB*-Mutante darauf hin, dass *in vivo* im Magen der Wüstenrennmaus andere Adhärenzfaktoren von Bedeutung sind als *in vitro* bei der Bindung an Kato III-Zellen und Magenbiopsie-Schnitte.

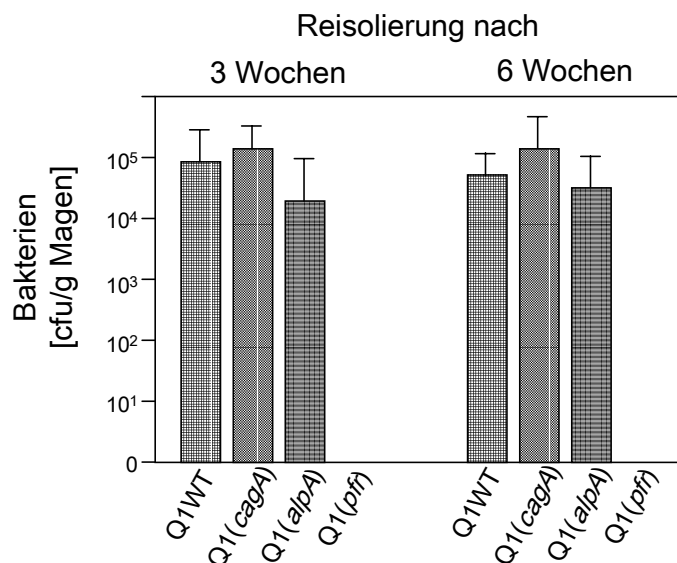


Abb. 17: Kolonisierungsfähigkeit der *H. pylori* Q1 *cagA*-, *alpAB*- und *pfr*-Mutanten im Magen von Wüstenrennmäusen.

Die Tiere wurden mit dem *H. pylori* WT-Stamm Q1 oder mit der *cagA*-, *alpAB*- und *pfr*-Mutante oral infiziert. 3 bzw. 6 Wochen nach der Infektion wurde den Tieren der Magen entnommen, homogenisiert und in geeigneten Verdünnungen auf Agarplatten ausplattiert. Nach 6 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt und auf 1 g Magengewebe standardisiert.

3.1.9.1 Die natürliche Transformationskompetenz von *H. pylori* ist für die Kolonisierung nicht essentiell

Das Auffinden einer *comB4* (*hp0017*)-Mutante in der Gruppe der *in vivo* essentiellen Gene in der STM-Suche legte die Vermutung nahe, dass die natürliche Transformationskompetenz von *H. pylori* einen Einfluss auf die Kolonisierungsfähigkeit haben könnte. Das Gen *comB4* kodiert nach vergleichenden Sequenzanalysen ein VirB4-homologes Protein und stellt eine essentielle Komponente eines Typ IV-Transportsystems in *H. pylori* dar, das für die Aufnahme von DNA verantwortlich ist (Hofreuter *et al.*, 2001).

Um experimentell zu überprüfen, ob die natürliche Transformationskompetenz einen Einfluss auf die Kolonisierungsfähigkeit hat, wurde eine weitere transformationsinkompetente *H. pylori*-Mutante hergestellt und deren Kolonisierungseigenschaft im Wüstenrennmausmodell getestet. Das *comB*-Operon mit den Genen *comB7*, *comB8*, *comB9* und *comB10*, deren Genprodukte Homologien zu VirB7, VirB8, VirB9 und VirB10 von *Agrobacterium tumefaciens* aufweisen, kodiert weitere strukturelle Komponenten dieses Typ IV-Transportsystems. Dabei sind die Proteine ComB8-10 essentiell für die DNA-Aufnahme, ComB7 hingegen scheint lediglich akzessorische Funktionen zu besitzen. Beim Plasmid pDHO35 wurden die Gene *comB8-10* aus der Genregion deletiert und durch ein *cat*-Gen ersetzt. Dieses Plasmid wurde zur Transformation von *H. pylori* Q1 eingesetzt. Die erhaltenen Mutanten bildeten kein ComB9, was im Western-Blot mit einem anti-ComB9 Antikörper gezeigt werden konnte (Abb. 18) und sind transformationsdefekt, was durch Transformationsversuche mit dem Plasmid pDH29 nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

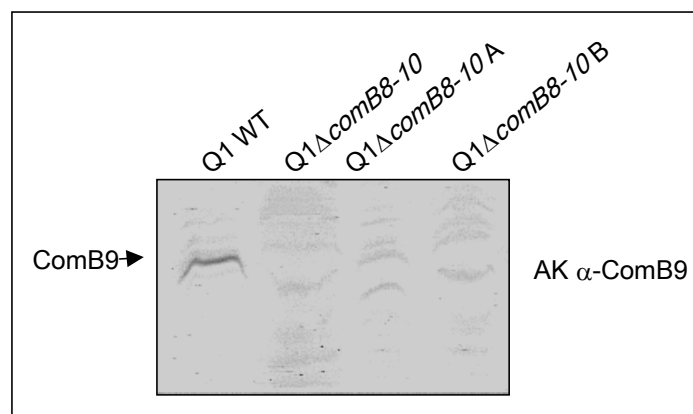


Abb. 18: Immunochemische Überprüfung einer *H. pylori* Q1- Δ *comB8-10*-Mutante.

Das Lysat eines Klon, der nach Transformation von *H. pylori* Q1 mit dem Suizidplasmid pDHO35 erhalten wurde, wurde zusammen mit dem Lysat eines *H. pylori* Q1 WT und je einem nach der Infektion reisolierten *H. pylori* Q1 Δ *comB8-10*-Klon aus Tier 1 (A) und Tier 2 (B) einer SDS-PAGE unterzogen, auf eine Zellulosemembran transferiert und im Western-Blot mit einem anti-ComB9-Antikörper analysiert.

Mit den erhaltenen Mutanten wurden 2 Wüstenrennmäuse oral infiziert. Drei Wochen nach der Infektion wurden die *H. pylori* *comB*-Mutanten quantitativ aus dem Magen der Wüstenrennmäuse reisoliert, und ihre Identität wurde im Western-Blot mit einem anti-ComB9 Antikörper überprüft (Abb. 18).

Die nach der Reisolation ermittelte Kolonisierungsrate betrug $3,0 \times 10^4$ Bakterien pro g Magengewebe (Abb. 19) und lag damit etwas niedriger als die ermittelten Werte der Kolonisierungsraten des *H. pylori* Q1-Wildtyps und der *cagA*-Mutante ($1,0 \times 10^5$ und $1,2 \times 10^5$ Bakterien/g Magen). Sie befindet sich damit im Bereich der schwach attenuierten *alpAB*-Mutante ($1,9 \times 10^4$ Bakterien/g Magen).

Die natürliche Transformationskompetenz stellt demnach unter den hier gewählten Bedingungen keinen zur Kolonisierung absolut essentiellen Faktor dar. Es bleibt zu identifizieren, welche Funktion des VirB4-homologen Proteins HP0017 zu dem beobachteten Kolonisierungsverlust der Mutante führt.

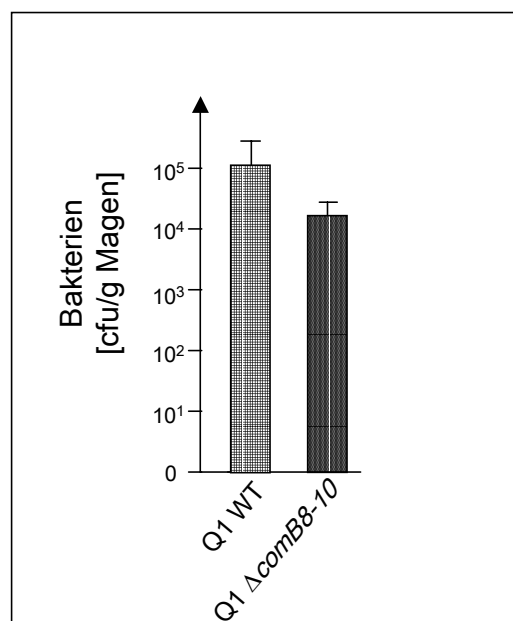


Abb. 19: Reisolierungsraten einer *H. pylori* Q1-*comB8-10*-Deletionsmutante.

Zwei Wüstenrennmäuse wurden oral mit einer *H. pylori* Q1 Δ comB8-10-Mutante infiziert. Nach 3 Wochen wurden die Bakterien reisoliert und quantitativ bestimmt.

3.1.10 Zyklopropan-Gruppen in der Zytoplasmamembran von *H. pylori* erhöhen die Resistenz gegen oxidativen Stress

Charakteristisch für die Zusammensetzung der Zytoplasmamembran bei *H. pylori* und weiteren im Magen kolonisierender *Helicobacter*-Spezies, wie beispielsweise *H. felis* und *H. mustelae*, ist der hohe Anteil (22-30%) an zyklopropanierten Fettsäuren. Im Gegensatz dazu weist die Zytoplasmamembran von intestinal-kolonisierenden *Helicobacter*-Spezies wie *H. pametensis* oder *H. muridarum* keine Zyklopropan-Gruppen in den Fettsäuren auf (Haque *et al.*, 1996).

Die physiologische Rolle zyclopropanierter Membranen könnte in ihrer geringeren Reaktivität gegenüber oxidierenden Substanzen liegen (Grogan und Cronan, 1997).

Es sollte getestet werden, ob eine *H. pylori-cfa*-Mutante, bei der das Gen, das für die Zyclopropan-Fettsäure-Synthase kodiert, durch eine TnHK9-Transposoninsertion getroffen ist, weniger resistent gegen oxidativen Stress ist als der Wildtyp. Dazu wurden Flüssigkulturen von beiden Stämmen und einer *H. pylori* Q1-Katalase-Mutante zur Kontrolle bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 angezogen und geerntet. Die Stämme wurden in 1 ml *Brucella*-Medium mit einer OD₅₅₀ von 0,05 resuspendiert und ohne bzw. mit 1 und 5 mM H₂O₂ aus einer 0,1 molaren Stammlösung versetzt. Die Stämme wurden daraufhin 1h unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37°C inkubiert, in mehreren Schritten verdünnt und auf Serumplatten ausplattiert. Nach 5 Tagen wurden die gewachsenen Kolonien gezählt und die Überlebensrate bestimmt (Abb. 20).

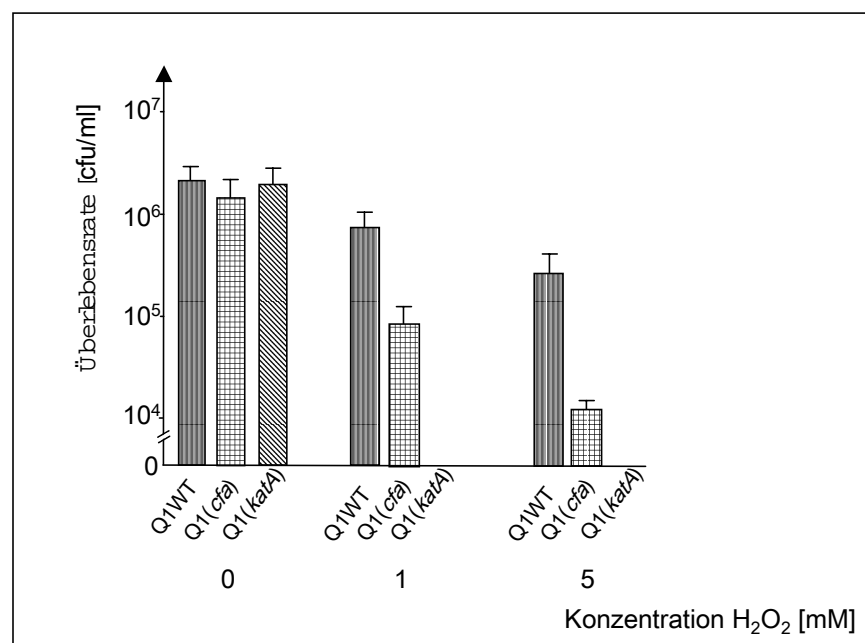


Abb. 20: *H. pylori* Q1 WT ist resistenter gegenüber oxidativem Stress als die *cfa*-Mutante.

H. pylori Q1 WT, *cfa*- und *katA*-Mutanten wurden in *Brucella*-Medium aufgenommen und 1 h mit Wasserstoffperoxid inkubiert. Die Suspensionen wurden verdünnt und auf Serumplatten ausplattiert. 5 Tage nach Inkubation wurden die Kolonien gezählt. Die Werte repräsentieren 3 Versuche.

Während ohne Zugabe von Peroxid alle 3 Stämme nahezu gleiche Koloniezahlen aufweisen, sank die Überlebensrate bei Inkubation mit 1 bzw. 5 mM

Peroxid bei der *cfa*-Mutante deutlich schneller als beim Wildtyp. Die Überlebensrate der *cfa*-Mutante nimmt von 0-5 mM um das 100 -fache ab, beim Wildtyp aber lediglich um das 10 -fache. Die *katA*-Mutante überlebt schon die einstündige Behandlung mit 1 mM Peroxid nicht.

Die im Gegensatz zur *cfa*-Mutante zyclopropanierte Zytoplasmamembran scheint einen Beitrag zur Resistenz gegenüber oxidativen Substanzen wie Peroxid zu liefern, obwohl diese Resistenz gegenüber dem durch die Katalasewirkung vermittelten Schutz eine weitaus geringere Rolle spielt. Dieser Vitalitätsverlust der *cfa*-Mutante könnte allerdings ausreichen, um bei der Kolonisierung des Magens unter *in vivo*-Bedingungen inaktiviert zu werden.

3.2 Der ORF HP0169 kodiert eine sekretierte Kollagenase

Es wird angenommen, dass eine Reihe intra- und extrazellulärer Enzyme von *H. pylori* direkt an der Schädigung des epithelialen Gewebes oder der Integrität der Mucinschicht im Magen beteiligt sind. Neben der Urease, deren toxische Reaktionsprodukte direkt und indirekt zu einer Schädigung der Epithelzellen führen, wird diese Rolle Neuraminidasen, Fukosidasen (Dwarakanath *et al.*, 1995), Phospholipasen (Dorrell *et al.*, 1999), Alkohol-Dehydrogenasen (Roine *et al.*, 1992) und auch Proteasen zugeschrieben (Windle und Kelleher, 1997). Dabei sind für die Neuraminidase-, Fukosidase- und die beschriebene Proteaseaktivität bei *H. pylori* weder die kodierenden Gene, noch deren Beteiligung am Infektionsprozess bekannt.

In der STM-Suche nach *in vivo* essentiellen Genen von *H. pylori* wurden zwei unabhängige Mutanten als kolonisierungsdefizient identifiziert, die Transposoninsertionen im Gen *hp0169* tragen. Nach vergleichenden Sequenzanalysen stellt HP0169 eine Protease aus der U32-Proteinfamilie dar (Abb. 21), die durch die Konsensussequenz E-x-F-x(2)-G-[SA]-[LIVM]-C-x(4)-G-x-C-x-[LIVM]-S gekennzeichnet ist (AS 163-181) (Rawlings und Barrett, 1993). Das einzige Mitglied dieser Familie, das biochemisch charakterisiert ist, ist das PrtC-Enzym von *Porphyromonas gingivalis*, eine Ca^{2+} -abhängige Metalloprotease mit kollagenolytischer Aktivität, die 29.4% Sequenzidentität und 49.5% Sequenzähnlichkeit zu HP0169 aufweist. Zudem weist HP0169 Homologien zu weiteren bekannten oder putativen bakteriellen Kollagenasen auf, wie zu PA5440

von *Pseudomonas aeruginosa* (41.0% / 60.8%), YdcP von *E. coli* O157:H7 (33.8% / 55.8%) und TTE1257 von *Thermoanaerobacter tengcongensis* (64,5% / 45,1%).

	1				50
HP0169	~~~~~	~~~~~MN	QVELLSPAGN	LKKLKIALNY	GADAVYGGVS
JHP0155	~~~~~	~~~~~LN	QVELLSPAGN	LKKLKIALNY	GADAVYGGVS
P.a.5440	~~~~~	~~~~~MTATT	RPELLCPAGT	LKSMRYAFAY	GADAVYAGQP
T.t.1257	~~~~~	~~~~~	MLELLAPVGD	LERLKVAVKY	GADAVYFGGQ
P.g.PrtC	~~~~~	~~~~~MNVN	DFEIMAPVGS	YESLMAAIKA	GADSVYFGIE
E.c.YdcP	VAKIXAIFQL	LDKNVTVSSH	RLELLSPARD	AAIAREAILH	GADAVYIGGP
	51				100
HP0169	HFSLRN	RAGK	EFTLET	FKEG	IDYAHALNKK
JHP0155	HFSLRN	RAGK	EFTLET	FKEG	IDYAHALDKK
P.a.5440	RYSLRV	RNN.	DFDHAQLAEG	IAEAHALGKR	FYVVVNIAPH
T.t.1257	NYSRLRAYVG.	.LTLD	EIKEG	VRYLKSNRK	AYITINIFPH
P.g.PrtC	GLNMRARSAN	NFTTE	DLYKI	AEICRDKGVK	SYLTVNTVIY
E.c.YdcP	GFGARHNASN	SL..KDIAEL	VPFAHRYGAK	IFVTLN	TILH
	101				150
HP0169	IDKMAE	LEPD	AFIIA	APGVV	KLALKIAPHI
JHP0155	LYKMAE	LEPD	AFIIA	APGVI	KLASKIAPHI
P.a.5440	LEPVVAMGPD	ALIMSDPGLI	MLVRQHFPQM	PIHLSVQANA	VNWAAVQFWR
T.t.1257	IKKVIDLGVD	AVIVSDLGVF	SIVKEIAP	EIDVHISTQANT	VNYLTANFWH
P.g.PrtC	IDAAQKAQIS	AIIASD..VA	AMMYANEIGV	EVHLS	TQLNI
E.c.YdcP	ITDLYQTGVD	ALIVQD..M.	GILELDIPPI	ELHASTQCDI	RTVEKAKFLS
	151				200
HP0169	DLGVKRIVCA	RELSLND	AIIE	IK.KALPN..LEL
JHP0155	DLGVKRIVCA	RELSLND	AVE	IK.KALPD..LEL
P.a.5440	QQGLTRVILS	RELSLE	EIEE	IRQQV.PD..MEL
T.t.1257	RLGAKRIILA	RELSLKEIKE	IRDKTPPS..LEL	EA
P.g.PrtC	RFA.DVVVLA	RELNMDQVRT	IHETIVRDNI	CGPKGHPVRI	EMFAHGALCM
E.c.YdcP	DVGFTQIVLA	RELNLDQIRA	IHQAT.....DATI	EFFIHGALCV
	201				250
HP0169	AFSGRCLISA	LQGRVPNRG	SCANDCRFDY	EYYVKNPDNG	VMMRL.....
JHP0155	AFSGRCLISA	LQGRVPNRG	SCANDCRFDY	EYYVKNPDNG	VMMRL.....
P.a.5440	AYSGRCLLSG	YINRDPNQG	TCTNACRWEY	KAVEGREDEL	GNVVAREPTL
T.t.1257	SYSGRCLLSN	YLTGRDANKG	ECAQPCRWKY
P.g.PrtC	AVSGKCYLSL	HEHNSSANRG	ACAQICRRGY	TVKDKDSGLE	LDIE.NQYIM
E.c.YdcP	AYSGQCYISH	AQGRSANRG	DCSQACRLPY	TLKD.DQGRV	VSYE..KHLL
	251				300
HP0169VEEEGVG	THIFNAKDLN	LSGHIAEILS
JHP0155VEEEGVG	THIFNAKDLN	LSGHIAEILS
P.a.5440	GRGAPTEQVF	LLEEGNRPG	EMAFAFDEHG	TYIMNSKDLR	AVQHVERLAR
T.t.1257Y	LMEE.KRPG	YFPIEEDGRG	TYILNSKDL	C
P.g.PrtC	SPKDLKTIHF	INKMMDAGVR	VFKIEGRARG	PEYVYTVCRC	YKEAIEAYC.
E.c.YdcP	SMKDNDQTAN	LGALIDAGVR	SFKIEGRYKD	MSYVKNITAH	YRQMLDAIE
	301				350
HP0169	SNAISALKIE	GRTKSSYYAA	QTTRIYRLAV	DDFYHNTLKP	SF...YASEL
JHP0155	SNAISALKIE	GRTKSSYYAA	QTTRIYRLAV	DDFYHNTLKP	SF...YASEL
P.a.5440	I.GVHSLKIE	GRTKSHYYVA	RTAQVYRQAI	DD.AAAGKP.	.FDRGLMDTL
T.t.1257	A.GVTSFKIE	GRNKSAYYVA	VVTRAYRKAI	DDYLEKGKDY	VFDRSLLEEV
P.g.PrtC	.NGTYDEEAI	GRW.DEQLAT	VFNRGFWDG.	..YLGQRLG	EWTHRYGSGA
E.c.YdcP	ERGDLARASS	GRT.EHFFVP	STEKTFHRGS	TDYFVNARKG	DIGAFDSEPKF
	351				400
HP0169	NTLKNRGFTD	GylMRRPFER	LDTQNHQTAI	SEGDF...QV	NGEITEDGRF
JHP0155	NTLKNRGFTD	GylMRRPFER	LDTQNHQTAI	SEGDF...QV	NGEITEDGRF
P.a.5440	ESLAHRGYTE	GFLRRHVHDE	YQNYQHGHS	SERQQFVGEL	TGERRDGLAE
T.t.1257	GKASHRGFTT	GfyfGRPGAD	AQNYESSKYI	RTHDFVGIVK	RYDPETRIAI

```

P.g.PrtC  TRQKI.YVGK GIKYFSRLGV AEFIESGEL HIGDEIVITG PTTGVIIQKV
E.c.YdcP  IGLPVGEVVK VAKDHLDAV TEPLANGDGL NVLIKREVVG FRANT.VEKT
          401                                     450

HP0169    FACKFTTTTN T.AYEIIAPK ...NAAITPI VNEIGKIYTF EKRSYLVLYK
JHP0155    FACKFTTTTN T.AYEIIAPK ...NAAITPI VNDIGKIYTF EKRSYLVLYK
P.a.5440    VEVKNRFQRG D.SVELMTPR GNLRLVEDL RNAAGEAIEV APGNHVVYL
T.t.1257    VEQRNRMFVG D.EVEVIGPK VQFKQKIEKM WDEEGREIEV APHPQMIVKI
P.g.PrtC    EEIRYELQTV EKATKGQRIS IPVKEKVRPS DKLYRFDKRE E~~~~~
E.c.YdcP    GENQYRVWPN EMPADLHKIR .PHHPLNRNL DHNWQQALTK TSSERRVAVD
          451                                     500

hp0169     ILLENNTELE TIHSGNVNLV RLPAPLPAPS FLRTQVRV~ ~~~~~
JHP0155     ILLENNTELE TIHSGNVNLV RLPAPLPAPS FLRTQVRV~ ~~~~~
P.a.5440     ALPEGLDLCY ALLMRDLQPG QDTRQPQAER SGGCAGKGAC GCAH~~~~~
T.t.1257     PVVNPVEELY ILRRESKKNV ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
P.g.PrtC     ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
E.c.YdcP     IELGGWQEQI ILTLTSEEGV SITHTLDGQF DEANNAEKAM NNLKDGLAKL

```

Abb. 21: Vergleich der Sequenz von HP0169 und JHP0155 mit den Sequenzen bekannter bakterieller Kollagenasen.

Die Aminosäuresequenz von HP0169 und JHP0155 wurde mit der Pileup-Funktion des Programms GCG mit bakteriellen Kollagenasen verglichen. Identische Aminosäuren sind rot, ähnliche blau dargestellt.

HP: *H. pylori*, Stamm 26695, JHP: *H. pylori*, Stamm J99, P.a.: *P. aeruginosa*, T.t.: *T. tengcongensis*, P.g.: *P. gingivalis*, E.c.: *E. coli*

Um zunächst zu klären, ob HP0169 eine proteolytische Aktivität besitzt, wurden Lysate von *H. pylori* Q1 und einer *hp0169*-Mutante mit Azocoll unter Schütteln bei 37°C für 14 h inkubiert und freigewordener Azofarbstoff photometrisch bestimmt. Abb. 22 zeigt, dass bakterielle Lysate des *H. pylori* Q1 WT-Stammes unter den getesteten Bedingungen etwa die doppelte Proteaseaktivität aufwiesen wie die *hp0169*-Mutante. Die Inhibierung der Metalloproteasen durch EDTA-Zugabe reduziert die Proteaseaktivität auf etwa ein Viertel der Proteaseaktivität des Wildtyps. Diese Ergebnisse lieferten erste Hinweise, dass es sich bei HP0169 tatsächlich um eine Protease handelt, die unter den gegebenen Versuchsbedingungen einen großen Anteil an der Gesamtproteaseaktivität der *H. pylori*-Zellen ausmacht.

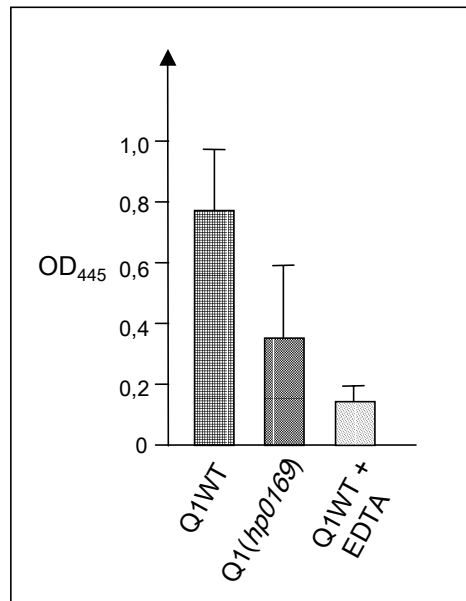


Abb. 22: Gesamtproteaseaktivität bakterieller Lysate von *H. pylori* Q1 WT und einer *hp0169*-Mutante.

Jeweils 100 µg Protein des Gesamtlysats von in *Brucella*-Flüssigmedium gewachsenen *H. pylori*-Zellen wurden in Probenpuffer bis 1 ml mit 1 mg Azocoll für 14 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Verbleibendes Azocoll wurde daraufhin abzentrifugiert und der Überstand bei 445 nm im Photometer gemessen. Die Balken repräsentieren drei Bestimmungen.

Aufgrund der Sequenzhomologien zu bakteriellen Kollagenasen, speziell der PrtC-Kollagenase von *P. gingivalis*, die zur gleichen Proteasefamilie gehört, wurde die kollagenolytische Aktivität von bakteriellen Überständen von *H. pylori* Q1 und der *hp0169*-Mutante getestet.

Dazu wurden der Q1-Wildtyp und die Mutante in *Brucella*-Flüssigmedium ohne Serum-, aber mit 1% Zyclodextrinsupplementation bis zu einer OD₅₅₀ von 0,2 angezogen. Die geringe optische Dichte der Kultur bei der Ernte wurde gewählt, um zu gewährleisten, dass sich die Bakterien in einer exponentiellen Wachstumsphase befanden und sich deshalb im Überstand keine zytoplasmatischen Proteine, hervorgerufen durch Lyse der Bakterien, befanden. Die Bakterien wurden bei 6000x g zentrifugiert, und anschließend wurde der Überstand abgenommen und nochmal zentrifugiert, um alle Bakterien zu sedimentieren. Der Überstand wurde mit 50% Ammoniumazetat gefällt und bei 100.000x g für eine Stunde zentrifugiert. Das Sediment wurde daraufhin einmal im Probenpuffer gewaschen und anschließend im Probenpuffer aufgenommen. Nach Dialyse gegen den Probenpuffer wurden die gefällten bakteriellen Überstände

zusammen mit Kollagen vom Typ 1 bei 37°C für 30 h inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die im Western-Blot mit einem Typ 1-Kollagen-spezifischen Antikörper analysiert wurden (Abb. 23).

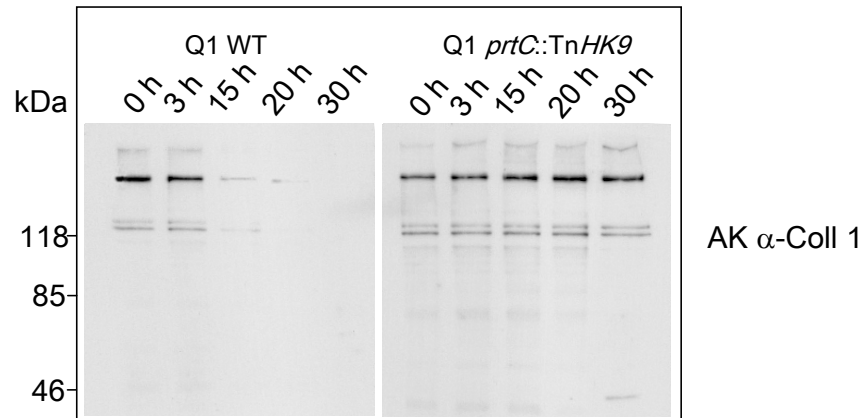


Abb. 23: Degradation von Typ1-Kollagen durch *H. pylori* Q1-Kulturüberstände.

Kulturüberstände von *H. pylori* Q1 und Q1 *prtC::TnHK9* wurden gefällt, in Probenpuffer resuspendiert und mit Typ1-Kollagen aus Kälberhaut bei 37°C inkubiert. Die Probenahme erfolgte nach den angegebenen Zeiten. Die Proben wurden auf einem Acrylamidgel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und im Western-Blot mit einem Kollagen-Typ1-spezifischen AK analysiert.

Während beim *H. pylori* Q1 Wildtyp das eingesetzte Typ 1-Kollagen zeitabhängig degradiert wird, ist bei der *hp0169*-Mutante keine Degradation zu erkennen (Abb. 23). Anders als bei eukaryotischen Kollagenasen, die Typ 1-Kollagen in distinkte Degradationsbanden (Seifter *et al.*, 1970) spalten, sind im Blot mit dem polyklonalen Antikörper, der gegen Gesamt-Typ 1-Kollagen gerichtet ist, keine spezifischen Degradationsprodukte zu erkennen, so dass man davon ausgehen kann, dass Kollagen zu kleinen Peptidfragmenten degradiert wird. Ein divalentes Metallkation ist für die Aktivität notwendig, da bei Zugabe von 10 mM EDTA zum Testansatz keine Kollagenaseaktivität zu detektieren war (Daten nicht gezeigt).

Zum Nachweis, dass der Überstand keine zytoplasmatischen Proteine enthält, wurden 20 µl der gefällten Überstandsfraktion im Western-Blot mit einem anti-RecA-Antikörper auf das Vorhandensein von RecA untersucht, das zytoplasmatisch lokalisiert ist (Schmitt *et al.*, 1995). Dass kein RecA-Protein im Western-Blot zu detektieren war, zeigte an, dass die verwendeten Überstandsfraktionen frei von zytoplasmatischen Proteinen waren (Abb. 24).

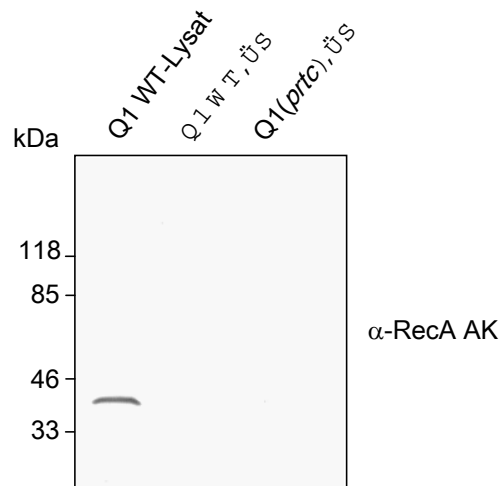


Abb. 24: Überprüfung der Überstandsfractionen hinsichtlich des Vorhandenseins zytoplasmatischer Proteine

Die zur Bestimmung der Kollagenaseaktivität eingesetzten Überstände (ÜS) von *H. pylori* Q1 WT und einer *H. pylori-prtC*-Mutante wurden nach Fällung mit 50% Ammoniumsulfat und Dialyse auf ein SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem anti-RecA-Antikörper analysiert. Als Kontrolle diente ein *H. pylori* Q1-Lysat.

3.2.1 Die Kollagenase PrtC degradiert kein humanes C1q

Eine Funktion bakterieller Proteasen im Infektionsprozess liegt in der Degradation von Komponenten des angeborenen oder erworbenen Immunsystems. So sezernieren eine Reihe mukosaler pathogener Organismen wie beispielsweise *Neisseria meningitidis* und *Proteus mirabilis* IgA1-degradierende Proteasen, was zu einem Verlust der Immunglobulinfunktion und einer Evasion der humoralen Wirtsantwort führt. Ebenso werden Komponenten der Komplementkaskade entweder unspezifisch, wie durch *P. aeruginosa* und *P. gingivalis*, oder spezifisch von bakteriellen Proteasen degradiert, wie die C5- und C5a-Komponente durch *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens* (Travis und Potempa, 2000).

Schon lange ist bekannt, dass C1q, die Komponente der Komplementkaskade, die den initialen Kontakt zu gebildeten Immunkomplexen herstellt, von der Kollagenase von *Clostridium histolyticum* degradiert werden kann (Paques *et al.*, 1979). C1q besteht aus 6 tripelhelikalen Strängen, die eine kollagenähnliche Struktur aufweisen und ansonsten sehr resistent gegen proteolytische Degradation sind.

Um zu testen, ob eine Degradation von C1q durch die sezernierte Kollagenase ein möglicher Weg für *H. pylori* ist, der durch die Komplementkaskade ausgelöste Lyse bzw. Phagozytose der Bakterien im Magen zu entkommen, wurde aus humanem Serum gereinigtes C1q mit einem bakteriellen Lysat von *H. pylori* Q1 bei 37°C inkubiert. Bei 0, 10, 20 und 30 Stunden erfolgte eine Probenahme, und anschließend wurden die Proben durch Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen anti-C1q-Antikörper auf die Degradation von C1q untersucht (Abb. 25)

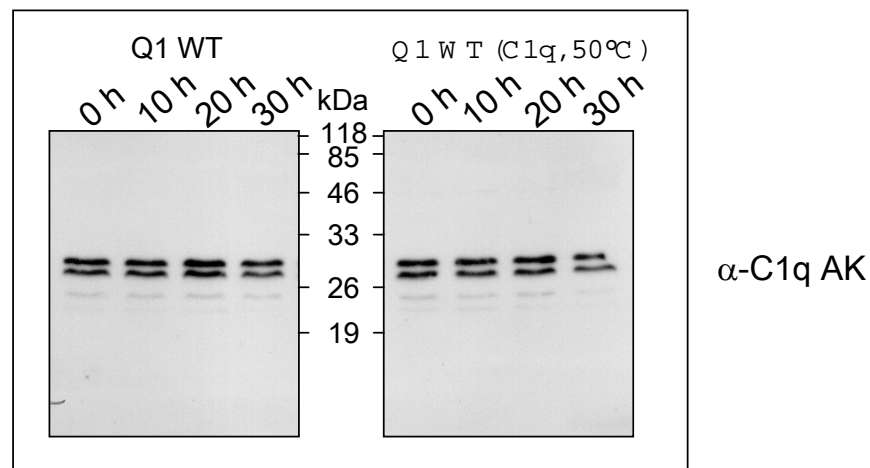


Abb. 25: Die Kollagenase PrtC degradiert den Komplementbestandteil C1q nicht.

Zur Degradation wurden je 100 µg bakterielle Lysate von *H. pylori* Q1 und einer *prtC*-Mutante mit 100 µl Testpuffer mit einer C1q-Konzentration von 2 mg/ml bei 37°C inkubiert. In einem Ansatz wurde das C1q vor der Inkubation 10 min bei 50°C denaturiert. Die nach 0, 10, 20 und 30 h entnommenen Proteinproben wurden in einer 10% -igen SDS-Page aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und im Western-Blot mit einem anti-C1q-Antikörper analysiert.

Unter den hier getesteten Bedingungen ist keine Degradation der drei C1q-Untereinheiten von 29, 26 und 22kDa nachweisbar. Auch bei Präinkubation des C1q für 10min bei 50°C, was zu einer partiellen Denaturierung und einer schnelleren Degradation durch die Kollagenase von *C. histolyticum* führt, ist keine Degradation zu detektieren. Das gleiche Lysat wurden anschließend im Kollagenasetest verwendet und wies kollagenolytische Aktivität auf.

3.2.2 Überproduktion und Reinigung von rekombinantem *H. pylori*-PrtC

Um zu demonstrieren, dass die zuvor beobachtete Kollagenaseaktivität tatsächlich auf das Genprodukt von *hp0169* zurückzuführen ist, wurde das Protein rekombinant in *E. coli* produziert und gereinigt.

Dazu wurde zunächst das Gen mit den Oligonukleotiden HP0169start und HP0169stop von *H. pylori* 26695-DNA als Matrize mittels PCR amplifiziert, mit *EcoRI/XhoI* restringiert und als *gst-prtC*-Fusionsgen in den Vektor pGEX4T3 kloniert. Das Konstrukt wurde in den *E. coli*-Stamm BL21 transformiert, dessen Gesamtproteaseaktivität im Vergleich zu anderen *E. coli*-Stämmen reprimiert ist.

Die Expression des *gst-prtC*-Fusionsgens wurde mit 1 mM IPTG bei 30°C für 2 h induziert. Der Erfolg der Überproduktion wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung des Gels und durch Western-Blot-Analyse mit einem anti-GST-Antikörper überprüft (Abb. 26).

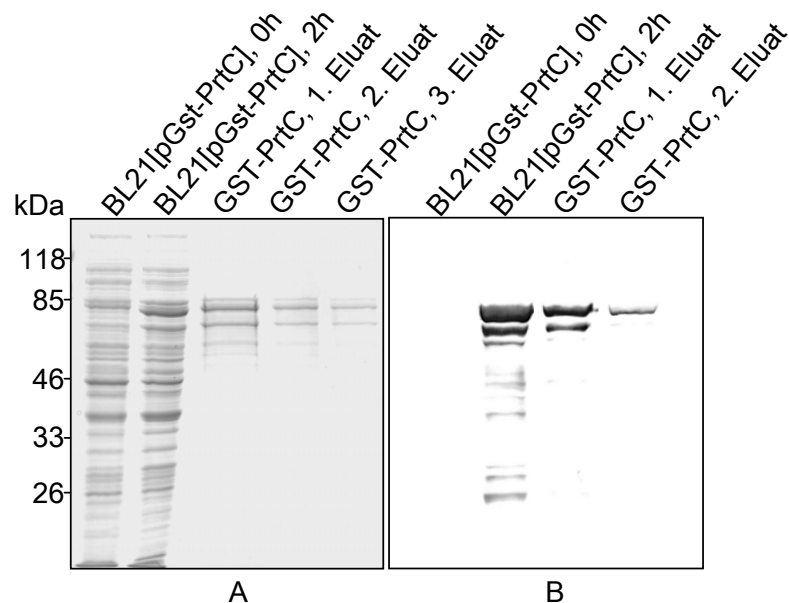


Abb. 26: Überproduktion und Reinigung des GST-PrtC-Fusionsproteins.

Das GST-PrtC-Fusionsprotein wurde durch Induktion mit IPTG im *E. coli*-Stamm BL21[pGst-PrtC] überproduziert. Die Reinigung erfolgte durch Bindung an Glutathion-Sepharose 4B und Elution mit 10 mM Glutathion. Die Proteine wurden auf einem 10% -igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt (A). Die Proben der Überproduktion und Reinigung wurden ebenfalls auf einem 10% -igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem anti-GST-Antikörper analysiert (B).

Das überproduzierte Protein besitzt eine molekulare Masse von etwa 70 kDa, was mit der vorhergesagten Masse von 72 kDa übereinstimmt. Das Protein wurde über Affinitätschromatographie mittels Glutathionsepharose gereinigt und im Testpuffer mit 10 mM Glutathion eluiert. Im Polyacrylamidgel waren nach Coomassie-Färbung eine Reihe von Proteinen mit einer geringeren molekularen Masse als das GST-PrtC-Fusionsprotein zu erkennen. Die Analyse der Eluate mit einem anti-GST-Antikörper zeigte, dass diese Proteine überwiegend

Degradationsprodukte des Fusionsproteins darstellten. Das Eluat wurde über Nacht gegen den Testpuffer dialysiert, und nachfolgend wurden 2 µg Fusionsprotein im Kollagenaseassay eingesetzt. Wie schon bei der Überstandsfraktion des *H. pylori* Q1 WT gesehen, wird Typ 1-Kollagen von dem GST-PrtC-Fusionsprotein zeitabhängig degradiert, wie im Western-Blot zu erkennen ist (Abb. 27).

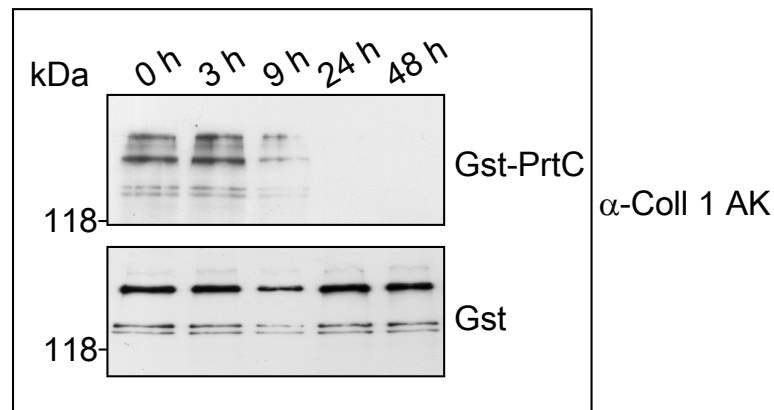


Abb. 27: Kollagen-Degradation mit gereinigtem PrtC-Protein.

Die rekombinant in *E. coli* überproduzierten Fusionsproteine GST-PrtC und GST wurden gereinigt, und je 2 µg davon wurden mit 100 µg Typ1-Kollagen aus Kälberhaut bei 37°C inkubiert. Die Probenahme erfolgte nach den angegebenen Zeiten. Die Proben wurden auf einem Acrylamidgel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und im Western-Blot mit einem Kollagen-Typ1-spezifischen AK analysiert.

Um auszuschließen, dass mitgereinigte Proteasen aus *E. coli* diese Degradation des Kollagens bewirken, wurde der Vektor pGEX4T3 in den *E. coli*-Stamm BL21 transformiert und das *gst*-Gen exprimiert. Das GST-Protein wurde gereinigt und in gleicher Konzentration wie das GST-PrtC-Fusionsprotein im Kollagenaseassay eingesetzt. In diesem Fall war keine Degradation der Kollagenbanden im Western-Blot zu erkennen (Abb. 27).

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass die schon in der Überstandsfraktion von *H. pylori* detektierte kollagenolytische Aktivität auf das PrtC-Protein zurückzuführen ist.

4 DISKUSSION

4.1 Signature-tagged-Mutagenesis (STM)

Der Vorgang der Kolonisierung eines Wirtes mit einem bakteriellen Pathogen ist durch eine Reihe von Schritten gekennzeichnet, die diesen Prozess sehr komplex machen. Neben der Fähigkeit zur Transmission in einen neuen Wirt benötigt das Bakterium Mechanismen, um zum Gewebe zu gelangen und dort spezifisch zu adhären. Zudem bedarf gerade ein potentiell über viele Jahre persistierendes Bakterium wie *H. pylori* Mechanismen zur Abwehr, Vermeidung und Nutzung wirtsspezifischer Abwehrmechanismen. Um im Wirt zu replizieren, müssen zudem Nährstoffe aus der Mikroumgebung der Wirtszellen erfolgreich aufgenommen und genutzt werden.

H. pylori war eines der ersten pathogenen Bakterien, dessen gesamte Genomsequenz zur Verfügung stand (Tomb *et al.*, 1999). Dennoch beschränken sich die bisher veröffentlichten genomweiten Ansätze auf die Identifikation von Faktoren, deren Rolle *in vitro* essentiell für die Viabilität des Bakteriums sind (Chalker *et al.*, 2001; Jenks *et al.*, 2001). Des Weiteren wurden Arbeiten veröffentlicht, in denen einzelne bakterielle Gene inaktiviert und der Einfluss der kodierenden Proteine bei der Kolonisierung getestet wurden (siehe Einleitung).

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal in einem funktionellen Genomansatz Faktoren von *H. pylori* identifiziert, die essentiell für die Kolonisierung und Persistenz dieses Bakteriums in der Magenmukosa sind. Die STM-Methode der individuellen Markierung und simultanen Infektion mit einer Gruppe von Mutanten erwies sich dabei als effizientes und verlässliches Werkzeug, eine große Anzahl von Mutanten mit einer minimalen Zahl von Versuchstieren zu testen. Dabei zeigte sich das Infektionsmodell der mongolischen Wüstenrennmaus als besonders geeignet. In keinem anderen *H. pylori*-Tiermodell wurde bisher von einer Kolonisierung eines Tieres mit verschiedenen *H. pylori*-Mutanten über einen Zeitraum von drei Wochen berichtet. Der niedrige pH-Wert des Magenumens und die durch *H. pylori* induzierte typische Gastritis, Magenulzeration und Kanzerogenese, die den Pathogeneseprozess mit der menschlichen Situation vergleichbar machen, sind weitere Gründe, die das Wüstenrennmausmodell gegenüber dem Mausmodell

favorisieren (Ikeno *et al.*, 1999). Andere Infektionsmodelle wurden aufgrund ihres experimentellen Aufwandes schon vorher für eine genomumfassende Suche nach Kolonisierungsfaktoren ausgeschlossen.

Aufgrund der im Vergleich zu anderen pathogenen Bakterien niedrigen bakteriellen Beladung der Magenmukosa mit *H. pylori* von etwa 10^5 Bakterien pro g Magengewebe, die im Modell der Wüstenrennmausinfektion vergleichbar mit der bakteriellen Beladung menschlichen Magengewebes ist, konnte nur ein Viertel der Sucheffizienz erreicht werden, die für das Modell der systemischen murinen Infektion mit *S. typhimurium* oder *Y. enterocolitica* beschrieben wird. Hier liegt die bakterielle Beladung des infizierten Gewebes mit 10^8 - 10^9 Bakterien pro g Milz aber deutlich höher als bei *H. pylori* (Igwe *et al.*, 1999; Hensel *et al.*, 1995)

Eine neu entwickelte PCR-Detektionsmethode zur Identifikation der Signaturen nach Reisolierung der kolonisierenden Mutanten machte eine effektive Analyse der Kolonisierungseigenschaften einer bakteriellen Mutante mit einer nichtradioaktiven, verlässlichen Standardmethode möglich. Diese Methode wurde mittlerweile auch in einer STM-Applikation für die Detektion 33 kolonisierungsdefizienter *P. aeruginosa*-Mutanten im Rattenlungen-Modell der chronischen *Pseudomonas*-induzierten Lungeninfektionen erfolgreich angewendet (Lehoux *et al.*, 2002).

Insgesamt wurden von 960 Mutanten, die in der STM-Suche eingesetzt wurden, 252 als kolonisierungsdefizient angesehen. Die daraus resultierende Quote von 26% für die Kolonisierung essentiellen Genen im Genom erscheint beim Vergleich mit bisher publizierten STM-Suchen nach *in vivo* essentiellen Genen zunächst hoch (siehe Tabelle 13). Sie ist zum Teil auf die hohe Redundanz der Mutanten zurückzuführen, die bei den essentiellen Genen mit dem Faktor 3,2 (77/252) anzugeben ist. Dieser Redundanzfaktor wird allerdings in keiner bisher publizierten STM-Applikation benannt, so dass sich keine Schlüsse über die dort erreichte Genomabdeckung ziehen lassen. Ein weiterer Grund für den hohen Wert ist darin zu sehen, dass *H. pylori* mit ca. 1,6 MBp das kleinste Genom der Pathogenen aufweist, die bisher in STM-Suchen analysiert wurden. In Tabelle 13, in der der Prozentsatz von Mutanten in essentiellen Genen an der Gesamtzahl der in der STM-Suche getesteten Mutanten der jeweiligen Genomgröße des Bakteriums gegenübergestellt ist, lässt sich die Tendenz erkennen, dass der Prozentsatz essentieller Mutanten mit kleiner werdender Genomgröße steigt.

Tabelle 13: Korrelation der zur Kolonisierung essentiellen Gene von Pathogenen zur Genomgröße

Bakterium	<i>in vivo</i> essentielle Gene [%]	Genomgröße [MBp]	Tiermodell	Publikation
<i>S. typhimurium</i>	3,5	4,9	Maus, systemische Infektion	Hensel <i>et al.</i> , 1995
<i>Y. enterocolitica</i>	3	4,7	Maus, systemische Infektion	Darwin und Miller, 1999
<i>V. cholerae</i>	5	3,0 + 1,1	Maus, intestinale Kolonisation	Chiang und Mekalanos, 1998
<i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i>	7,5	2,2	Neonatale Ratte, Sepsis	Jones <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptococcus</i> <i>pneumoniae</i>	13	2,0	Maus, Pneumonie	Polissi <i>et al.</i> , 1998
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	16	2,8	Maus, Abszess, Wunde, Bakteriämie	Coulter <i>et al.</i> , 1998
<i>H. pylori</i>	26	1,6	Wüstenrennmaus, Magenkolonisation	diese Arbeit

Zudem gilt *H. pylori* als höchst spezialisierter und an den gastralen Lebensraum stark angepasster Keim (Doig *et al.*, 1999). Diese Anpassung spiegelt sich nicht nur in den geringen metabolischen Fähigkeiten sondern auch in der geringen Anzahl regulatorischer Gene wider. So lassen sich im Genom von *H. pylori* lediglich 4 Gene finden, deren Produkte HTH-(„helix-turn-helix“) Motive und damit mögliche DNA-Bindungseigenschaften aufweisen, während das *E. coli*-Genom 148 solcher Gene enthält. Ein weiteres Beispiel ist die Ausstattung mit 2-Komponenten-Regulationssystemen. Während sich in *E. coli* etwa 40 solcher Systeme finden lassen, die eine Adaptation an verschiedene Umweltbedingungen zulassen, sind es im Genom von *H. pylori* lediglich vier (Tomb *et al.*, 1997).

Das relativ kleine Genom, das geringe metabolische Repertoire und die begrenzten regulatorischen Fähigkeiten lassen einen hohen Anteil *in vitro* essentieller und damit nicht mutagenisierbarer Gene im *H. pylori*-Genom vermuten. Diese Vermutung wird durch die hohe Redundanz der hier untersuchten Gene unterstützt, wobei auch eine überdurchschnittlich häufige Integration des Tn5-basierten TnHK9-Transposons an bestimmte Stellen im Genom und eine

höhere Transformationseffizienz bestimmter Sequenzabschnitte dafür verantwortlich sein kann.

Letztlich wird eine Kombination aus bereits begonnenen Arbeiten, die entweder auf vergleichende Computeranalysen gestützt sind (Chalker *et al.*, 2001) oder auf einer systematischen Mutagenese basieren („Gen nach Gen“) (Jenks *et al.*, 2001) die Anzahl *in vitro* essentieller Gene bei *H. pylori* identifizieren. Einen Beitrag dazu liefern auch alle in dieser Arbeit identifizierten Transposoninsertionen in *in vivo* essentiellen wie nicht essentiellen Genen, denn experimentell lässt sich der Nachweis der Wichtigkeit eines Gens für die Viabilität *in vitro* nur durch eine negative Selektion führen.

4.1.1 Motilität und Säureresistenz: essentielle Faktoren für eine erfolgreiche Kolonisierung

Die Fähigkeit zur Motilität und Chemotaxis sind für eine Reihe pathogener Bakterien essentiell für die Kolonisierung eines Wirtes und die Etablierung einer stabilen Infektion. *H. pylori* besitzt ein unipolares Bündel von 2-6 Flagellen. Beide Komponenten des copolymeren Filaments FlaA und FlaB sind als unerlässliche Kolonisierungsfaktoren von *H. pylori* bei der Kolonisierung gnotobiotischer Ferkel bekannt (Eaton *et al.*, 1996).

Mutanten in *flaA* wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls als kolonisierungsdefizient identifiziert, genau wie Mutanten in *fliD*, dessen Genprodukt an der Spitze des Filaments lokalisiert ist und die Inkorporation der Flagellinmonomere fördert. Essentiell für die Kolonisierung ist ebenfalls HpaA, das das Filament als Bestandteil der Flagellenscheide vor Säuredepolymerisation schützt. Zusätzlich scheint es an der Adhärenz an Epithelzellen beteiligt zu sein, indem es an Sialinsäure und andere sialylierte Glykokonjugate bindet (Evans *et al.*, 1988; Evans *et al.*, 1993). Neben diesen Komponenten des Filaments konnten Komponenten des Flagellenhakens (FlgD, FlgE, FlgK, FliS), des Basalkörpers (FlgC, FlgG, FlgH, FliF) und des Export-Apparates (FliI, FliP) als kolonisierungsrelevante Faktoren identifiziert werden.

Wie in *Salmonella* und *Caulobacter crescentus* ist auch in *H. pylori* die Expression der Flagellengene streng hierarchisch reguliert. An der Regulation sind sowohl die σ -Faktoren 70 als auch σ^{28} bei *Salmonella* bzw. σ^{54} bei *Caulobacter* beteiligt. Aus der Genomsequenz lassen sich bei *H. pylori* drei Sigma-Faktoren,

σ^{70} , σ^{54} und σ^{28} , ableiten, die alle in der hierarchischen Regulation der Flagellengene beteiligt sind (Spohn and Scarlato, 1999). Fünf mögliche Operone, die 7 Basalkörper- und Haken-Gene (*flgB*, *flgC*, *flgG*, *flgE*, *flgE'*, *flgK*, *flgL*) enthalten, besitzen in ihrer stromaufwärts gelegenen Sequenz σ^{54} -Erkennungssequenzen. Die Expression dieser σ^{54} -regulierten Gene ist zusätzlich vom Transkriptionsaktivator FlgR abhängig, der stromaufwärts vom σ^{54} Promotor bindet (Spohn und Scarlato, 1999). Der Sigma-Faktor 54 stellt eine mittlere Hierarchiestufe in der Regulation der Expression der Flagellengene dar, obwohl mit *flaB* auch ein Gen reguliert wird, das Bestandteil des Filaments ist. Dass das Hauptflagellin FlaA durch σ^{28} reguliert ist (Suerbaum *et al.*, 1993), unterstützt ein Modell, nach dem das FlaA/FlaB-Verhältnis im Filament in Abhängigkeit der äußeren Bedingungen variiert (Leying *et al.*, 1992).

Da *H. pylori* im Magenlumen auch bei Anwesenheit von Harnstoff nur kurze Zeit überleben kann, wird die gerichtete Bewegung auf die Epithelzellen durch die Mucinschicht als wichtiger Schritt im Kolonisierungsprozess angesehen. Zwei Komponenten, die an der Weiterleitung des extrazellulären Signals vom Rezeptor zum Flagellenmotor beteiligt sind, sind hier als *in vivo* essentiell im Wüstenrennmaus-Modell nachgewiesen worden. CheA und CheV3 stellen ein Zwei-Komponenten-System dar, bei dem CheA die Histidin-Kinase und CheV3 den Regulator darstellt. CheV3 (HP0393) gehört zur Gruppe von drei CheV-Proteinen (HP0393, HP0019, HP0616), die sich aus der Genomsequenz von *H. pylori* ableiten. Sie besitzen aminoterminal Homologien zu CheW und carboxyterminal zur Regulator-Domäne der CheY-Familie. Da mit HP1067 und HP0393 weitere Orthologe aus der CheY-Regulator-Familie vorkommen, ist unklar, welche das Signal von CheA weiterleiten.

Gene für drei klassische MCP („methyl-accepting-proteins“)-Proteine lassen sich in der *H. pylori*-Genomsequenz finden (*hp0099*, *hp0082*, *hp0103*), die durch ihre periplasmatische Domäne die Bindung an Chemoattraktanten vermitteln. Ein weiteres Gen, *hp0599* kodiert wahrscheinlich ein cytoplasmatisch lokalisiertes MCP-Protein. Interessanterweise führt eine Transposoninsertion in *hp0103* nicht zu einem Kolonisierungsdefekt der Mutante. Als Chemoattraktanten sind bisher Harnstoff, Bicarbonat (Mizote *et al.*, 1997) und Mucinbestandteile (Turner *et al.*, 1997) identifiziert worden, wobei unklar ist, durch welche MCP diese Attraktanten gebunden werden. Da all diese Attraktanten von der Apikalseite der

Magenepithelzellen abgegeben werden, führt der Ausfall eines MCP offensichtlich nicht zu einer Änderung der gerichteten Taxis.

Neben diesen Flagellen- und Chemotaxis-Genen, von denen einige bereits als *in vivo* essentiell beschrieben wurden, validieren auch die Mutanten in Genen des Urease-Clusters die Ergebnisse der STM-Suche insgesamt. Die Gene *ureA* und *ureB*, die für strukturelle Untereinheiten des Ureaseenzym kodieren, waren die ersten Gene, deren Notwendigkeit für den Infektionsprozess von *H. pylori* gezeigt werden konnte (Eaton *et al.*, 1991). Beide Gene bilden ein Operon im Urease-Gencluster. Ein weiteres bilden die Gene *ureIEFGH*, deren Produkte mit Ausnahme von Urel bei der Inkorporation von Nickelionen in das Apoenzym beteiligt und für ein vollständig aktives Enzym notwendig sind (Mobley *et al.*, 1995). Urel hingegen ist das einzige Gen, dessen Produkt nicht am Aufbau des aktiven Enzyms beteiligt ist (Skouloubris *et al.*, 1998). Urel stellt eine pH-regulierte Permease in der inneren Zytoplasmamembran dar, die bei pH-Werten unter pH 5,0 Harnstoff über die Membran ins Zytoplasma transportiert (Weeks *et al.*, 2000). Die hier gefundene Wichtigkeit von Urel *in vivo* untermauert Daten, nach denen die Permeabilität biologischer Membranen für Harnstoff ($4 \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$) selbst bei sehr unphysiologisch hohen Harnstoffkonzentrationen von 200 mM nicht ausreicht, um die Ureaseaktivität zu sättigen (Scott *et al.*, 1998).

4.1.2 *In vivo* essentielle Transportprozesse

Aus vergleichenden Genomanalysen und biochemischen Daten ist deutlich geworden, dass *H. pylori* nur ein geringes Biosynthesepotential besitzt und viele essentielle Biosynthesevorstufen nicht *de novo* synthetisieren kann (Hazell und Mendz, 1997). Diese Limitierung macht die Aufnahme dieser Vorstufen über geeignete Transportsysteme notwendig, von denen viele als unerlässlich für das Überleben von *H. pylori* angesehen werden (Alm und Trust, 1999).

Untersuchungen in verschiedenen *H. pylori*-Stämmen haben die Notwendigkeit der exogenen Aufnahme der Aminosäuren Arginin, Histidin, Leucin, Isoleucin, Valin, Methionin und Phenylalanin gezeigt, die auch durch Homologieuntersuchungen der beiden sequenzierten Stämme unterstützt wird (Nedenskov, 1994; Reynolds und Penn, 1994). Obwohl die Aminosäuren Prolin und Glutamat theoretisch auch *de novo* synthetisiert werden können, wurden in dieser Arbeit die Permeasen PutP zur Prolinaufnahme und GltS zur

Glutamataufnahme als *in vivo* essentiell für die Kolonisierung gefunden. Prolin kann nach der Aufnahme durch das Enzym PutA, dessen Gen stromaufwärts im gleichen putativen Operon wie *putP* liegt, zu Glutamat oxidiert werden. Denkbar ist ebenfalls eine Rolle von Prolin als kompatibles Solut bei der Osmoadaptation von *H. pylori* im Magen, wie für viele Gram-positive und -negative Bakterien gezeigt wurde (Sleator und Hill, 2002). Bei steigender Osmolarität wird möglicherweise Prolin durch Betain mittels ProP, einer Prolin/Betain-Permease ersetzt. Bei *E. coli* trägt allerdings das ProP-System mehr zur Aufnahme von Prolin als kompatibles Solut bei als das hochaffine PutP-System, das in diesem Organismus dazu dient, Prolin als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle aufzunehmen. Beide Systeme sind als virulenzassoziiert bekannt: Eine Deletion von *proP* in einem uropathogenen *E. coli*-Stamm führt zu einer deutlichen Reduktion der Kolonisierungseigenschaften im Harntrakt der Mäuse (Culham *et al.*, 1998). Auch eine *putP*-Mutante in *S. aureus* zeigt einen deutlich attenuierten Phänotyp im Mausmodell (Schwan *et al.*, 1998).

Glutamat ist eine der häufigsten freien Aminosäuren im Magensaft (Komorowska *et al.*, 1981) und stellt möglicherweise zusammen mit anderen Aminosäuren eine zentrale C-Quelle für *H. pylori* im Magen dar. Versuche von Mendz und Hazell (1995) zeigen, dass *H. pylori* in einem Carboanhydrat-freien Medium, das aus einer Mischung von angebotenen Aminosäuren als alleiniger C-Quelle besteht, gute Wachstumsraten aufweist. Aus dem Gemisch wurden nur Arginin, Aspartat, Asparaginsäure, Glutamat, Glutamin und Serin in signifikanten Mengen verwertet. Bei Zugabe von Glukose zum Aminosäuregemisch wurden zunächst die Aminosäuren metabolisiert.

Für die Bedeutung von Aminosäuren als C-Quelle spricht auch die Notwendigkeit des Dpp-Dipeptidtransportsystems (Abb. 28). Der in dieser Arbeit gefundene, lediglich zu einer Attenuierung führende Phänotyp des periplasmatischen Bindeproteins DppA bedeutet möglicherweise, dass weitere periplasmatische Bindeproteine für Dipeptide vorhanden sind. Ein Kandidat wäre HP1099, das ebenfalls Homologien zu periplasmatischen Aminosäure-Bindeproteinen besitzt.

Neben Aminosäuren wird die Rolle der C- und Energiequelle auch organischen Säuren zugeschrieben, da sich in der Genomsequenz neben einer Glukose-Permease kein weiteres Aufnahmesystem für Saccharide finden lässt, aber diverse Aufnahmesysteme für organische Säuren vorhanden sind (Doig *et al.*,

1999). Neben zwei Laktat-Permeasen und einem C4-Dicarboxylat-Transporter findet sich eine α -Ketoglutarat-Permease, die, wie in dieser Arbeit gezeigt, für die Kolonisierung des Wüstenrennmaus-Magens notwendig ist.

Daneben spielen zwei Multiresistenz-Proteine eine Rolle bei der Kolonisierung. Diese Gruppe der Transporter ist für die intrinsische Resistenz von Bakterien gegen eine Vielzahl antimikrobieller Agentien verantwortlich (Zgurskaya, 2002). Obwohl die transportierten Substrate in ihrer chemischen Struktur wenige Gemeinsamkeiten besitzen, ist ihnen doch gemein, dass sie eine hydrophobe Domäne besitzen, die ein Eintauchen in die Phospholipidschicht der Membran gewährleistet (Nikaido *et al.*, 1998). Dass es sich bei dem essentiellen Multiresistenz-Protein HP1082 funktionell um einen Lipid A-Transporter handelt, wie aus der Annotation hervorgeht, ist unwahrscheinlich, da die Akkumulation von Lipid A in der *E. coli-msbA*-Mutante toxisch ist (Zhou *et al.*, 1998). Strukturelle Ähnlichkeiten konnten zudem bislang allerdings bei Multiresistenz-Proteinen nicht mit gleicher Substratspezifität korreliert werden (Zgurskaya, 2002).

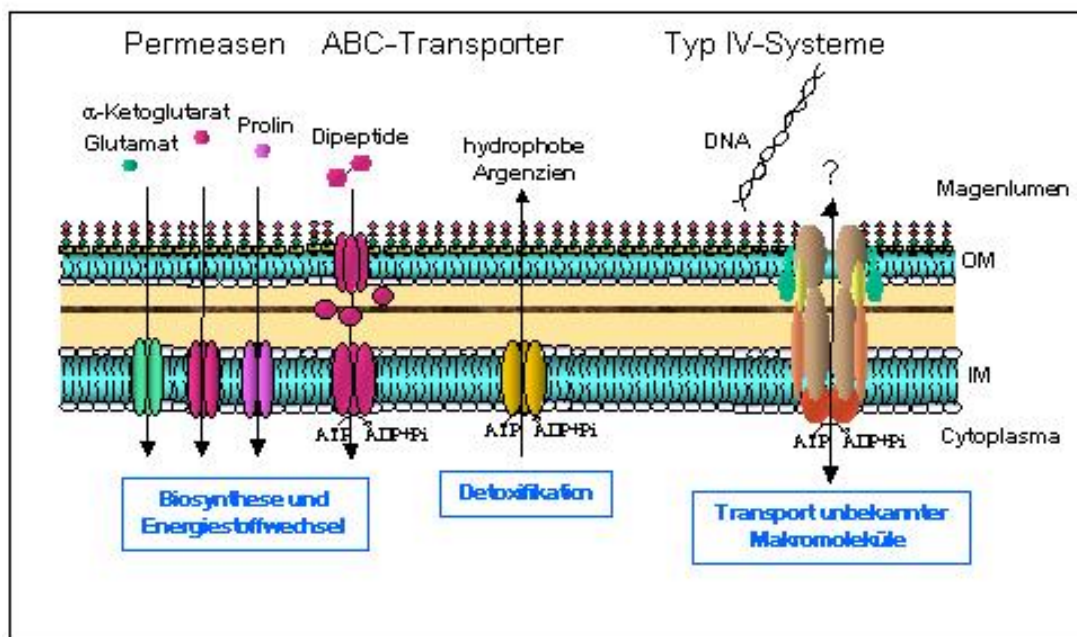


Abb. 28: Essentielle Transportprozesse von *H. pylori* im Magen

Erklärungen im Text. IM = innere Membran, OM = äußere Membran

Überraschend stellten sich zwei Transport-ATPasen, die mit Typ IV-Sekretionssystemen assoziiert sind und Homologen zu VirB4 (HP0017) und VirB11 (HP1421) besitzen, als essentiell *in vivo* heraus. Das von *hp0017* kodierte VirB4-Homolog wurde kürzlich als strukturelle Komponente bei der DNA-

Aufnahme in *H. pylori* durch ein Typ IV-Transportsystem identifiziert (Hofreuter *et al.* 2001). *In vivo*-Experimente mit einer *H. pylori-comB8-10*-Deletionsmutante, die ebenfalls transformationsdefizient ist, ließen allerdings nicht den Schluss zu, dass die natürliche Transformationskompetenz einen Einfluss auf die Kolonisierungsfähigkeit von *H. pylori* hat. Ebenso unklar bleiben die Ergebnisse zur Essentialität der *virB11*-Mutante. Da das Gen *hp1421* in einem Operon mit *flil* und *fliQ* liegt, die beide Komponenten des Export-Apparates des Flagellensystems kodieren, äussern Porwollik *et al.* (1999) die Vermutung, dass es sich um eine Flagellen-assoziierte Export-ATPase handeln könnte. Die Mutante zeigt allerdings auf Weichagarplatten keine Motilitätsdefekte gegenüber dem Wildtyp. Da *hp1421* Mutanten weder einen Transformationsdefekt aufweisen (persönliche Mitteilung A. Karnholz) noch in der Lage sind, CagA in Epithelzellen zu translozieren, scheint das Genprodukt an keinem der beiden in *H. pylori* identifizierten Typ IV-Transportsysteme beteiligt zu sein.

4.1.3 Essentielle Kolonisierungsfaktoren der Zellhülle

Komponenten der Zellhülle stellen bei der Kolonisierung einen initialen Kontakt zwischen dem Wirtsorganismus und dem Pathogen her. Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien besteht aus der inneren und äußeren Membran und der Mureinschicht. Den Komponenten der äußeren Membran kommt dabei als Grenze zwischen Zelle und Umgebung eine besondere Bedeutung zu. Äußere Membranen besitzen eine substanzgrößenabhängige Permeabilität und bieten dem Pathogen einen wirksamen Schutz vor hydrolytisch wirkenden Enzymen, Detergenzien und hydrophoben antimikrobiellen Substanzen.

4.1.3.1 Die Gruppe der äußeren Membranproteine

Die Analyse der Genomsequenz der *H. pylori*-Stämme J99 und 26695 haben Gene für 32 äußere Membranproteine, die sogenannten OMP, identifiziert. Sie machen mehr als 4% der kodierenden Sequenz beider Stämme aus und lassen sich aufgrund ihrer Sequenzhomologien in verschiedene Gruppen einteilen (Alm *et al.*, 2000).

Die bei der Kolonisierung des Wüstenrennmaus-Magens essentiellen OMP dieser Suche befinden sich zum Großteil in der Gruppe der 21 Hop-Proteine (HP0252 attenuiert, HP0254, HP0923, HP1177), die aufgrund eines

hochkonservierten N-terminalen Motivs (AEX[D,N]G) klassifiziert wurden. Mit HopZ und AlpAB sowie BabB, das an Lewis b- und SabB, das an Lewis x-Strukturen bindet, stammen alle bisher in *H. pylori* für die Bindung an Magenepithelzellen charakterisierten OMP aus dieser Gruppe. Das legt die Vermutung nahe, dass es sich auch bei den essentiellen Hop-Mitgliedern aus der STM-Suche um Adhäsine handeln könnte (Abb. 29). Exner *et al.* (1995) konnten allerdings 5 Proteine dieser Gruppe (HopA-E) als unspezifische Porine ohne erkennbare Ionenselektivität identifizieren, die, verglichen mit anderen Porinen einen nur kleinen wassergefüllten Kanal bilden, was als Grund für die hohe Toleranz gegenüber hydrophilen Antibiotika angesehen wird. Leider lässt sich aus Sequenzhomologien kein Schluss daraus ziehen, bei welchen Mitgliedern der Hop-Gruppe es sich um Porine bzw. Adhäsine handelt. So weisen die als Adhäsine bekannten OMP BabB und HopZ speziell im C-Terminus große Homologien zu den Porinen HopA und HopD auf, so dass die Funktion der identifizierten essentiellen OMP dieser Gruppe im Infektionsprozess ungeklärt bleibt.

Die weiteren in der STM-Suche gefundenen OMP-Mutanten weisen Transposoninsertionen in Genen der Hor- und Hof-Familie auf (Alm *et al.* 2000). Bisher ist für keines der OMP dieser Gruppen eine Funktion gefunden worden. Interessanterweise ist aber festzustellen, dass alle bei der Kolonisierung nicht essentiellen OMP (HP0472, HP0671, HP1395) der Hor-Familie angehören. Transposoninsertionen in Genen, die für die zwei Hof-Mitglieder HP0468 und HP0788 kodieren, führten zu einem Kolonisierungsdefekt.

Unerwartet war, dass eine *alpAB*-Mutante in der Einzelinfektion im Wüstenrennmausmodell nur einen leicht attenuierten Phänotyp aufwies, obwohl *alpAB*-Mutanten *in vitro* eine stark verringerte Adhärenz an Kato III-Zellen und Magenbiopsien aufweisen (Odenbreit *et al.*, 1999). Der Grund dafür kann darin liegen, dass die Expression einer Reihe von *omp*-Genen über Phasenvariation reguliert ist (Tomb *et al.*, 1997). Ähnlich wie bei den Opa-Proteinen von *Neisseria gonorrhoeae* kann so durch „slipped strand mispairing“ die Ausstattung der äußeren Membran verändert werden (Stern *et al.*, 1986). Durch diese Variation, der unter anderem auch die Adhäsine BabB, SabA und HopZ unterliegen, mag es zu einer Anpassung der Adhärenzeigenschaften des Bakteriums kommen. So wird möglicherweise die Wichtigkeit einzelner Adhäsine während der Infektion als

Antwort auf sich verändernde Rezeptoren des Magenepithels während des Inflammationsprozesses verändert (Mahdavi *et al.*, 2002). Diese Phasenvariation der *omp*-Gene erklärt möglicherweise auch die unterschiedliche Beurteilung der Kolonisierungseigenschaften einer *oipA*-Mutante (*hp0638*). Während Akanuma *et al.* (2002) die Mutante bei einer Einzelinfektion im Wüstenrennmausmodell als kolonisierungsdefizient klassifizieren, wird sie in dieser Arbeit als kolonisierend angesehen. Es ist möglich, dass die hier verwendete Mutante ein *oipA*-Gen besitzt, das durch „slipped strand mispairing“ nicht exprimiert wird.

4.1.3.2 Die VacA-paralogen Proteine

Wie die Gruppe der OMP besitzen auch die VacA-Paralogen HP0610, HP0922 und HP0289, die in beiden sequenzierten *H. pylori*-Stämmen zu finden sind, eine putative β -Faltblattstruktur im C-Terminus, die durch alternierende hydrophile und hydrophobe Aminosäurereste gebildet wird und in der Membran ein sogenanntes β -Fass bildet.

Die Proteine weisen 48%, 51% und 50% Homologien zu VacA auf, wobei hauptsächlich der C-terminale Teil für die Homologien verantwortlich ist. Die Proteine HP0289 und HP0922, die beide als essentiell für die Kolonisierung ausgemacht wurden, stellen aufgrund ihrer Homologie auch im N-Terminus eine eigene Gruppe innerhalb der drei VacA-Paralogen dar. Die zelluläre Lokalisation bleibt allerdings spekulativ, da, obwohl alle drei VacA-Paralogen als OMP annotiert sind (Tomb *et al.*, 1997), kein Protein das Dicysteinsignal in der putativen N-terminalen Signalsequenz aufweist, an der das VacA-Protein prozessiert wird. Dennoch besitzen alle drei Proteine putative Signalsequenzen.

Der als Passagierdomäne bezeichnete Teil der Proteine wird nach Durchtritt durch das β -Fass bei den bekannten Autotransportern auf der Zelloberfläche entweder durch eine Protease vom in der Membran verbleibenden β -Fass abgeschnitten, wie im Fall des VacA-Toxins, oder verbleibt auf der Bakterienoberfläche, wie bei der IgA-Protease von *N. meningitidis* (Henderson und Nataro, 2001). Bei *H. pylori* ist die VacA-prozessierende Protease auf der Zelloberfläche genausowenig bekannt wie die spezifische Schnittstelle, so dass sich über das Schicksal der VacA-Paralogen auf der Zelloberfläche kaum spekulieren lässt. Unwahrscheinlich erscheint eine Funktion der VacA-Paralogen als vakuolisierendes Zytotoxin, denn der Effekt der Vakuolisierung bei Infektion

von Magenepithelzellen mit *H. pylori*-Stämmen, die ein aktives *vacA* exprimieren, verschwindet bei einer Infektion mit einer *vacA*-Mutante vollständig (Schmitt und Haas, 1994).

Sequenzvergleiche der putativen Passagierdomäne von HP0289 ergeben Homologien zum 260 kDa Protein LspA1, einem sekretierten filamentösen Hämagglutinin des genitale Ulzerationen verursachenden *Haemophilus ducreyi* (Ward *et al.*, 1998). Ebenfalls ergeben sich Homologien zur IgaA2-Serin-Protease von *Neisseria meningitidis*. Diese Proteine repräsentieren jeweils die zwei Hauptvirulenzfunktionen der Passagierdomänen bakterieller Autotransporter als Adhäsion oder Protease (Henderson und Nataro, 2001).

Interessanterweise fanden Windle und Kelleher bei der Identifizierung und Charakterisierung einer Metalloprotease im Überstand von *H. pylori*, dass die Proteaseaktivität mit einem Protein einer molekularen Masse von über 200 kDa assoziiert ist (Windle und Kelleher, 1997). Aus der Genomsequenz wird deutlich, dass nur die ORFs *hp0289*, *hp0922*, *hp0610*, die für die VacA-Paralogen kodieren, und *hp1198* bzw. *hp0527* Proteine kodieren könnten, die schwerer als 200 kDa sind. *Hp1198* kodiert aber für RpoB, die β -Untereinheit der DNA-Polymerase, und *hp0527* für ein VirB10-Homolog des Cag-Typ IV-Translokationsapparates.

Beide biologischen Aktivitäten, die Adhärenz an Zielzellen und eine Proteaseaktivität, sollten bei einer weiteren Untersuchung der biologischen Relevanz der VacA-Paralogen in Betracht gezogen werden (Abb. 29).

4.1.3.3 Das Lipopolysaccharid

Die äußerste Komponente der Zellhülle stellt das LPS dar. Frische klinische *H. pylori*-Stämme weisen ein glattes LPS mit einer langen O-spezifischen Seitenkette und Lewis x- und/oder Lewis y-Strukturen auf (Simoons-Smit *et al.*, 1996). Auch beim LPS kommt es durch Phasenvariationen der verschiedenen Glykosyltransferasegene zu einer großen Heterogenität (Appelmelk *et al.*, 1999). Die Wichtigkeit einer intakten O-spezifischen Seitenkette im Infektionsprozess wurde von Logan *et al.* (2000) demonstriert. Eine Mutante im Gen für die β -1,4-Galaktosyltransferase, die nur eine verkürzte Seitenkette ausbildet, zeigt im Mausmodell einen attenuierten Phänotyp, was konsistent zu den hier gewonnenen Daten ist, nach denen eine *galE*-Mutante kolonisierungsdefizient ist. Die Rolle des LPS bei der Infektion scheint dabei zum einen in der Vermittlung eines relativen

4.1.3.4 Die Phospholipidmembran

Die Zusammensetzung der Phospholipidmembran von *H. pylori* ist für Gram-negative Bakterien ungewöhnlich, wobei vor allem der hohe Anteil zyclopropanierter C19-Fettsäuren (22-30%) auffällt, die neben den Myristolsäuren (41-55%) den Hauptanteil der Fettsäuren stellen (Geis *et al.*, 1990). Die Synthese erfolgt über den Einbau einer Methylgruppe vom C1-Gruppendonator S-Adenosyl-Methionin in die Doppelbindung einer ungesättigten Fettsäure, katalysiert durch die Zyclopropan-Fettsäure-Synthase (Grogan und Cronan, 1997).

Die entsprechende Mutante im *H. pylori*-Stamm Q1 erwies sich als attenuiert bei der Kolonisierung des Wüstenrennmaus-Magens. Eine zyclopropanierte Membran scheint für *Helicobacter* unter den Bedingungen des Magens einen Kolonisierungsvorteil zu bieten. In einer Untersuchung der Lipidzusammensetzung der Phospholipidmembranen von 13 *Helicobacter*-Arten fiel Haque *et al.* (1996) auf, dass die Arten, die aus dem Magen der Wirtsorganismen isoliert wurden, wie *H. pylori*, *H. felis*, *H. mustelae*, *H. nemestrinae* und *H. acinonyx*, zyclopropanierte Fettsäuren besitzen, intestinal kolonisierende *Helicobacter*-Arten hingegen nicht. Die biologische Funktion zyclopropanierter Phospholipidmembranen ist nicht vollkommen geklärt, scheint aber in der erhöhten Resistenz gegenüber toxischen Umweltbedingungen zu liegen. So weisen zyclopropanierte Fettsäuren eine höhere Resistenz gegenüber Oxidationsprozessen, induziert durch Ozonolyse und Behandlung mit anderen Sauerstoffradikalen als die entsprechenden unzyclopropanierten Fettsäuren auf (Grogan und Cronan, 1986; Yuan *et al.*, 1995). Dieser Effekt ist auch beim Vergleich der Überlebensraten von *H. pylori* Q1 und der *cfa*-Mutante bei Behandlung mit H₂O₂ zu beobachten. Allerdings ist die Überlebensrate gegenüber dem Wildtyp nur reduziert, während eine Katalase-Mutante, die in der STM-Suche auch als attenuiert angesehen wurde, unter gleichen Bedingungen nicht überlebt.

Die Ausbildung einer Gastritis im Magen, gekennzeichnet durch die massive Infiltration von Zellen der angeborenen Immunabwehr, beginnt im Wüstenrennmausmodell nach ca. 2 Wochen, ist aber erst nach 4 Wochen ausgeprägt zu beobachten (Matsumoto *et al.*, 1997). Die Neutrophilen, polymorphkernigen Granulozyten und Makrophagen bedingen in dieser Zeit im infizierten Gewebe durch die Produktion radikalischer Intermediate oxidativen Stress. So ist anzunehmen, dass sowohl die Katalase als auch die

zyclopropanierte Membran mehr als Persistenzmechanismen von *H. pylori* anzusehen sind denn als Faktoren für die initiale Kolonisierung. Diese Vermutung wäre experimentell durch eine längere Kolonisierungszeit als 3 Wochen zu prüfen. Eine zusätzliche pathophysiologische Bedeutung der zyclopropanierten Fettsäuren von *H. pylori* könnte in der Hemmung der H^+/K^+ ATPase-Aktivität der Parietalzellen und damit einer Reduktion der Säuresekretion im Magen liegen. Dieser antisekretorische Effekt wurde nicht nur mit 19:0cyc Fettsäuren, sondern auch mit ganzen *H. pylori*-Zellen beobachtet (Beil *et al.*, 1994).

4.1.4 Ein regulierter Eisenhaushalt ist für *H. pylori* essentiell für das Überleben *in vivo*

Im Magen wird Eisen durch peptischen Verdau von aufgenommener Nahrung freigesetzt und kann durch Laktoferrin, dem Hauptferritin mukosaler Gewebe, gebunden werden. Dies führt zu stark schwankenden Eisenkonzentrationen im Magen. Wie viele andere pathogene Bakterien benötigt auch *H. pylori* Systeme, um Eisen zu akquirieren und die intrazelluläre Eisenkonzentration auch bei sich ändernden äußeren Konzentrationsbedingungen konstant zu halten.

Der komplette Verlust der Fähigkeit einer *H. pylori-pfr*-Mutante, den Magen von Wüstenrennmäusen zu kolonisieren, zeigt zum ersten Mal die Notwendigkeit der Eisenspeicherung von *H. pylori* im Magen. Verschiedene *in vitro*-Versuche unter Bedingungen, die die *in vivo*-Situation nachahmen, lassen auf die physiologische Bedeutung des Pfr-Proteins bei der Adaptation an die Bedingungen im Magen schließen. Während der Wildtyp einen Wechsel von eisenreichen zu eisenlimitierten Bedingungen überlebt, indem durch Pfr gespeichertes Eisen remobilisiert wird, wächst die Mutante unter diesen Bedingungen nicht (Waidner *et al.*, 2002). Unter eisenreichen Bedingungen wird im Wildtyp freies Eisen durch Pfr akkumuliert, eine Reaktion, die auch die höhere Eisentoleranz gegenüber der Mutante erklärt (Bereswill *et al.*, 1998).

Freie Eisenionen im Medium katalysieren die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale durch die Fenton-Reaktion. Eine Bindung dieser freien Eisenionen durch Ferritine schützt Bakterien gegen diese Form von oxidativem Stress (Andrews, 1998). Die Notwendigkeit des Pfr-Proteins zeigt auch, dass ein weiteres mögliches Ferritin in *H. pylori*, das NapA-Protein, die regulierte

Eisenspeicherung von Pfr nicht ersetzen kann. NapA besitzt Homologien zu Bakterioferritinen und ist in *in vitro*-Experimenten in der Lage, bis zu 500 Eisenionen zu binden (Tonello *et al.*, 1999). Aber trotz eines Promotors mit Fur-ähnlichen Bindestellen stromaufwärts des *napA*-Startkodons (Evans *et al.*, 1995) wird im Gegensatz zu *pfr* die *napA*-Expression bei Eisenmangel- oder Eisenüberschussbedingungen nicht reguliert (Dundon *et al.*, 2001).

Eisenionen werden von *H. pylori* durch unterschiedliche Systeme aufgenommen. Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien, die Fe^{3+} -Ionen als primäre Eisenquelle nutzen, ist *H. pylori* im Magen auf die Aufnahme von Fe^{2+} -Ionen, die bei niedrigen pH- Werten und niedriger Sauerstoffkonzentration im Magen stabilisiert werden, durch das FeoB-System angewiesen (Velayudhan *et al.*, 2000). Unter eisenlimitierten Bedingungen kann Eisen auch durch Aufnahme von Laktoferrin (Dhaenens *et al.*, 1997) oder durch Aufnahme von Fe^{3+} -Dicitrat-Komplexen durch den Fec- Fe^{3+} -Dicitrat-Transporter aufgenommen werden. Interessanterweise finden sich in der Genomsequenz von *H. pylori* drei Gene, deren Produkte Homologien zu FecA, einem Fe^{3+} -Dicitrat-Rezeptor der äußeren Membran, besitzen (*hp0686*, *hp0889*, *hp1400*). Dass die *hp1400-fecA*-Mutante 3 Wochen nach der Infektion im Wüstenrennmausmagen überleben kann, zeigt möglicherweise, dass der Aufnahme von Fe^{3+} -Ionen im anaeroben und sauren Milieu des Magens keine so entscheidende Bedeutung zukommt wie der Fe^{2+} -Ionenaufnahme. Möglich ist weiterhin, dass die 3 FecA-Homologen unterschiedliche Bindungsaffinitäten besitzen und in der Lage sind, sich gegenseitig zu komplementieren.

4.1.5 Die Gruppe der essentiellen hypothetischen Proteine besitzt ein hohes Potential als Angriffspunkt für spezifische Antiinfektiva

Die Suche nach *in vivo* und *in vitro* essentiellen Genen von *H. pylori* ist durch die zur Verfügung stehenden Genomsequenzen stark unterstützt worden. Bis auf die Ureaseuntereinheiten UreA und B und die Flagellenbausteine FlaA und FlaB stammen alle Arbeiten, in denen *in vivo* essentielle Gene von *H. pylori* identifiziert wurden, aus der postgenomischen Ära (siehe Tabelle 1). Während die Funktion von 58% der offenen Leserahmen im *H. pylori*-Genom aus funktionellen Analysen oder durch Sequenzvergleiche vorhergesagt werden können, besitzen

18,5% der kodierten Proteine Orthologe unbekannter Funktion in anderen Organismen, 23,5% sind *H. pylori*-spezifisch (Alm *et al.*, 1999).

Gerade in der letzten Gruppe dieser hypothetischen Proteine befindet sich wahrscheinlich eine große Anzahl Proteine, die neuartige und *H. pylori*-spezifische Kolonisierungs- und Persistenzmechanismen darstellen. Die Identifikation der Funktion dieser Proteine wäre ein wichtiger Schritt, um Kandidaten auszuwählen, die für die Entwicklung neuer, spezifischer Therapeutika geeignet sein könnten, die in Zukunft möglicherweise eine Alternative zur bisherigen antibiotikabasierten Therapie bieten. Durch die bisherige Therapie mit Protonenpumpeninhibitor und entweder Amoxicillin und Metronidazol, oder Amoxicillin und Clarithromycin kann *H. pylori* in 80-90% der Fälle eradiziert werden. Allerdings machen die weltweit ansteigenden Resistenzen gegen diese Antibiotika, die von ihnen verursachten Nebenwirkungen als Hauptgrund für ein Therapieversagen sowie die Probleme bei der erneuten Behandlung von Therapieversagern die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten notwendig.

Als ein Anfang zur funktionellen Charakterisierung konnte durch die STM-Anwendung die Frage der Bedeutung *in vivo* für 58 hypothetische Proteine beantwortet werden, von denen 21 essentiell sind oder zu einem attenuierten Phänotyp der Mutanten *in vivo* führen. Von diesen 21 ORF sind 16 *Helicobacter*- bzw. *Campylobacter*-spezifisch und 5 codieren für putative Proteine mit Homologien zu Proteinen anderer Organismen, deren Funktion noch unbekannt ist. Interessanterweise sind die als essentiell identifizierten ORF in allen 15 von Salama *et al.* (2000) per „Microarray“ analysierten *H. pylori*-Stämmen konserviert, was auf die Bedeutung der Gene im Infektionsprozess schließen lässt. Eine Ausnahme bildet lediglich der ORF *hp0217*, der nur in 47% der Stämme gefunden wurde.

Ein zur STM-Analyse komplementärer Ansatz zur Validierung von möglichen therapeutisch nutzbaren Angriffspunkten unter den hypothetischen Proteinen ist die Suche nach Proteinen, die nicht nur *in vivo*, sondern auch *in vitro* essentiell für das Überleben von *H. pylori* sind. In diesem Ansatz wird genomweit untersucht, welche ORF sich im *H. pylori*-Genom mutagenisieren lassen und welche nicht, um sie danach als essentiell oder nicht essentiell *in vitro* einzustufen (Judson und Mekalanos, 2000). Obwohl diese Suche genomweit noch nicht unternommen wurde, sind die benötigten molekularbiologischen Werkzeuge

mittlerweile vorhanden, um jeden *H. pylori*-ORF durch ein effektives System zu klonieren und zu mutagenisieren (Jenks *et al.*, 2001).

Eine weitere Quelle zur Aufklärung der biologischen Funktion bislang hypothetischer Proteine wird die Konstruktion von Protein-Protein-Interaktionskarten sein, die, basierend auf „yeast 2-hybrid“-Untersuchungen, Genom- und Proteomdaten verbinden. Eine bislang noch unvollständige Protein-Protein-Interaktionskarte wurde bereits für *H. pylori* erstellt und liefert für eine Reihe von hypothetischen Proteinen potentielle Bindungspartner, die z.T. bereits biochemisch charakterisiert sind und so einen Anhaltspunkt für weitergehende biochemische Untersuchungen liefern können (Rain *et al.*, 2001). Diese Untersuchung hat auch mögliche Bindungspartner einiger als *in vivo* essentiell identifizierter hypothetischer Proteine geliefert. Es wird zu prüfen sein, welche der angeführten Interaktionen aus der „yeast 2-hybrid“-Untersuchung *in vivo* relevant sind (siehe Tabelle 14).

Erst wenn es gelingt, die biologische Funktion der hypothetischen, *Helicobacter*-spezifischen Proteine zu entschlüsseln, ist es möglich, das Potential dieser Proteine als hochspezifische Ziele zu nutzen, um in Zukunft Therapeutika zu entwickeln, die aufgrund ihrer Spezifität weniger Nebenwirkungen aufweisen als die bisher zur Verfügung stehenden.

Tabelle 14: Vergleich der als essentiell *in vivo* identifizierten ORFs der STM-Suche mit in Datenbanken hinterlegten Proteinen

HP-ORF	Spezifität ¹	Vorkommen in anderen <i>H. pylori</i> -Stämmen ² [%]	mögliche Interaktionen des kodierten Proteins ³
0018	H, C	100	-
0036	A	100	HP0975, GatC
0217	H	47	-
0245	H	100	-
0288	H, C	100	HP0071, Urel
0304	H	100	HP0411, hp; HP0132, SdaA; HP0950, AccD
0350	H	100	-
0367	H	100	-
0368	H	100	HP1293, RpoA; HP0897, hp; HP0435, hp
0754	H	100	-
0758	A	100	-
1175	A	100	-

1184	A	100	-
1250	H	100	-
1359	H	100	-
1363	A	100	-
1440	H	100	-
1454	H	100	HP0241, hp
1486	H	100	HP0071, Urel
1487	H	100	-
1525	H	100	-

1: Die Spezifität der *H. pylori*-Proteine wurde nach der Auswertung der Homologien von Rain *et al.*, 2001 übernommen. H: *H. pylori*-spezifisch, keine signifikanten Homologien zu bekannten Proteinen, C: lediglich Homologien zu *Campylobacter*-Proteinen, A: Homologien zu Proteinen anderer Bakterien

hp: hypothetisches Protein

2: Das Vorkommen der ORF wurde in 15 klinischen Isolaten per „Microarray“ überprüft (Salama *et al.*, 2000).

3: Mögliche Interaktionen der Proteine aufgrund von Protein-Protein-Interaktionen aus einer unvollständigen „yeast 2-hybrid“-Untersuchung nach Rain *et al.*, 2001. Aufgeführt sind nur die nach dem PIM Biological Score® wahrscheinlichen Interaktionen der Kategorie A (siehe <http://hybrigenics.com>).

4.1.6 Kolonisierung durch Nutzung extrazellulärer Wirtszellproteine

Viele pathogene Bakterien sekretieren Proteasen, die bei der Infektion und Persistenz der Bakterien im Wirt von großer Bedeutung als Virulenzfaktoren sind (Travis und Potempa, 2000). Dabei spielen viele der untersuchten Proteasen eine Rolle bei der Nutzung von Proteinen als C- oder Energiequelle. Darüberhinaus greifen sie in Abwehrmechanismen der Wirtszellen ein und inaktivieren oder deregulieren beispielsweise die Aktivierung der Komplementkaskade, das Zytokin-Netzwerk und sind zudem an der Degradation von zellulären Rezeptoren und der Inaktivierung von Proteaseinhibitoren der Wirtszellen beteiligt (Maeda, 1996).

Das Genprodukt von *hp0169* konnte in dieser Arbeit als extrazelluläre, sekretierte Protease identifiziert werden. Dabei ist es die dritte beschriebene sekretierte Protease in *H. pylori* und die erste, für die eine Beteiligung im Infektionsprozess nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zur Proteaseaktivität der von Windle und Kelleher (1997) identifizierten Protease, die eine molekulare Masse von über 200 kDa aufweist, besitzt das *hp0169*-Genprodukt nach Vorhersagen aus der Genomsequenz und der Expression des Gens als *gst*-Fusion eine molekulare Masse von 48 kDa. Damit unterscheidet sich die Masse von der 60 kDa schweren Protease, die Gooz *et al.* (2001) in Überstandsfractionen von *H. pylori*-Kulturen gefunden haben. Für keine der beiden

zuvor identifizierten Proteasen ist das kodierende Gen oder die Substratspezifität bekannt. Die proteolytische Aktivität des 200 kDa Proteins wurde lediglich mit Azocasein als allgemeinem Protease-Substrat bestimmt, während das 60 kDa-Protein durch seine caseinolytische Aktivität als Protease identifiziert wurde.

Vergleichende Sequenzanalysen weisen HP0169 als Protease der U32-Familie mit hohen Homologien zur PrtC-Kollagenase von *P. gingivalis* aus. Wie dieses Enzym ist auch das PrtC-Protein von *H. pylori* in der Lage, Kollagen vom Typ 1 zu degradieren. Dennoch ist die weitere Spezifität des Enzyms zu testen, denn viele bakterielle Kollagenasen degradieren mehrere Kollagentypen, wobei das nur wenig hydroxylierte Typ1-Kollagen von den meisten bakteriellen Kollagenasen verdaut werden kann (Harrington, 1996). Es ist dennoch möglich und wahrscheinlich, dass die Degradation von Typ 1-Kollagen von *H. pylori* auch *in vivo* eine wichtige Rolle spielt, denn Kollagen vom Typ 1 und 3 ist Bestandteil der extrazellulären Matrix des Magenepithels. Bei der Heilung von Gastralulzerationen wird die Synthese dieser Typen in den Epithel- und mesenchymalen Zellen induziert (Gillesen und Domschke, 1994; Podolsky, 1999). Die extrazelluläre Matrix moduliert daraufhin Zell-Zell-Interaktionen und baut ein extrazelluläres Netzwerk auf, das die Migration von Epithelzellen ermöglicht (Raghow, 1994). Die Sekretion eines Kollagen Typ 1 degradierenden Enzyms ist so durch die Störung des Heilungsprozesses möglicherweise für den chronischen Verlauf von Duodenal- und Gastralulzerationen bei einer *H. pylori*-Infektion mitverantwortlich.

Eine Reihe möglicher Funktionen der sekretierten Kollagenase im Infektionsprozess sind vorstellbar. Das Auflösen interzellulärer Verbindungen könnte dem Bakterium ein tieferes Vordringen in die Region der Submukosa ermöglichen, um so möglicherweise dem mit der ständigen Erneuerung der Mucinschicht einhergehenden Auswaschen ins Magenlumen zu entgehen oder anaerobe Bedingungen zum Wachstum zu bieten. Die Schaffung einer anaeroben Umgebung scheint bei vielen anaeroben und fakultativ anaeroben Pathogenen die Hauptfunktion sezernierter Kollagenasen zu sein (Harrington, 1996).

Einige bakterielle Proteasen und Kollagenasen greifen bei der Infektion in Prozesse der Immunabwehr ein, indem Antikörper oder Elemente der Komplementkaskade degradiert werden. So ist die Kollagenase von *C. histolyticum* in der Lage, C1q, den initialen Faktor der Komplementkaskade im

humanen Serum, an dessen tripel-helikalen, kollagenähnlichen Domänen zu degradieren und so eine Bindung der C1r- und C1s-Komponenten zu verhindern (Paques *et al.*, 1979). Eine analoge Funktion des PrtC-Enzyms bei dieser Art der Immunevasion konnte nicht gezeigt werden.

Es ist wahrscheinlich, dass die Bedeutung der sezernierten Kollagenase in der Freisetzung von Wirtszellkollagen und der Nutzung der Degradationsprodukte für metabolische Zwecke zu suchen ist. Kollagen besteht zu fast 30% aus Prolin bzw. Hydroxyprolin, und die Aufnahme dieser Aminosäure durch die PutP-Permease hat sich ebenso als essentiell *in vivo* herausgestellt wie die Aufnahme von Dipeptiden durch den Dpp-ABC-Transporter. Ob dabei die Kollagenase die Kollagenstrukturen bis auf Aminosäure- bzw. Dipeptidniveau degradiert oder ob andere Proteasen beteiligt sind, ist zu klären. Wie *H. pylori*, der zwar Glukose aufnehmen kann, aber *in vitro* und voraussichtlich auch *in vivo* nicht als primäre C-Quelle nutzt (Mendz und Hazell, 1995), sind auch viele asaccharolytische Pathogene auf die Aufnahme von Aminosäuren und kleinen Peptiden angewiesen. Man nimmt an, dass dazu bei *Flavobacterium meningosepticum* (Grimwood *et al.*, 1994) und *P. gingivalis* (Bedi und Williams, 1994) die von diesen Pathogenen sezernierte Kollagenase notwendig ist, um Wirtszellproteine *in vivo* zu nutzen.

Es ist interessant, dass die Essentialität eines sekretierten Proteins durch eine STM-Methode entdeckt wurde, denn man könnte erwarten, dass Kollagenase-positive Mutanten im Eingabegemisch den Defekt der *prtC*-Mutante komplementieren könnten. Da dies nicht möglich ist, liegt möglicherweise an der im Vergleich zu anderen Pathogenen geringen Infektionsrate von 10^5 Bakterien pro g Magengewebe und des Infektionsortes. Die Mucinschicht ist eine hochviskose Glykoproteinschicht, die die Diffusion von H^+ - und HCO_3^- -Ionen sowie CO_2 deutlich verringert (Tanaka *et al.*, 2002) und die Diffusion größerer Proteine, z.B. der Verdauungsenzyme des Magens, zum Schutz des Epithels nahezu vollständig verhindert. So degradiert eine von adhärennten *H. pylori*-Bakterien in den extrazellulären Raum sezernierte Kollagenase vermutlich das Kollagen nur lokal am Ort der Infektion.

Ein weiteres Beispiel, dass sezernierte Proteine, die im Infektionsprozess eine Rolle spielen, durch eine STM-Suche identifiziert werden können, liefert die Identifizierung einer Proteasemutante von *Proteus mirabilis*, die im Mausmodell der aufsteigenden Harnwegsinfektion einen attenuierten Phänotyp aufwies. Auch

in diesem Modell lag die Kolonisierungsrate nur bei 10^5 Bakterien pro g Harnblasengewebe (Zhao *et al.*, 1999).

Neben der hier identifizierten Kollagenase ist mit der Phospholipase A2 ein weiteres Protein bekannt, dessen Rolle im Infektionsprozess von *H. pylori* voraussichtlich in der Degradation von Wirtszellkomponenten liegt. PldL-Mutanten weisen eine deutlich geringere Phospholipase- und hämolytische Aktivität als der *H. pylori*-Wildtyp auf und ließen sich weder 2 noch 8 Wochen nach Infektion aus dem Magen infizierter Mäuse reisolieren (Dorrell *et al.*, 1999). Die Phospholipase A2-Aktivität lässt sich auch *in vivo* nachweisen, wo sie zu einer Zerstörung der Phospholipidschicht an der Apikalseite Mucin-sekretierender Zellen und damit zu einer Erosion der Epithelschicht führt (Berstad *et al.*, 1994; Ottlecz *et al.*, 1993).

4.1.7 Ausblick

Die durch den in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Genomansatz gewonnenen Daten zu neu identifizierten Kolonisierungsfaktoren *in vivo* bieten eine breite Grundlage für die nähere, detaillierte Charakterisierung einzelner am Infektionsprozess beteiligter Genprodukte. Besonders im Vordergrund stehen sollte dabei die Erforschung von bakteriellen Faktoren, die die spezielle Situation im rigiden Lebensraum des menschlichen Magens reflektiert.

Bei der Untersuchung einzelner Gene und ihrer Beteiligung am Infektionsprozess wird es eine Aufgabe sein, den Phänotyp eindeutig mit einem Gen zu korrelieren, da in der STM-Suche viele der Gene in einer Operon-Struktur integriert sind und polare Effekte des Transposons nicht ausgeschlossen werden können. Hierzu sollte ein System entwickelt werden, das es ermöglicht, die durch Transposon-Insertion beeinflusste Genexpression der Mutanten durch die Einführung einzelner Gene *in vivo* zu komplementieren.

Die untersuchten 960 Mutanten stellen keine genomumfassende Suche dar. Bei der Generierung der *H. pylori*-Mutantenbank wurden noch ca. 1200 weitere Mutanten hergestellt, die bisher noch nicht im Wüstenrennmaus-Modell auf ihre Kolonisierungsfähigkeiten getestet wurden. Trotz der beobachteten Redundanz einiger getesteter Mutanten bieten diese Mutanten ein hohes Potential, weitere Faktoren zu identifizieren, die ebenfalls an der Kolonisierung und der Persistenz von *H. pylori* im Magen beteiligt sind. Dazu müssen Strategien entwickelt werden, um solche Mutanten vor der Infektion von Versuchstieren zu

selektieren, die Transposon-Insertionen in bisher noch nicht getesteten Genen besitzen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Helicobacter pylori kolonisiert die Magenmukosa von etwa 50% der Weltbevölkerung und persistiert dort für Jahre, wenn das Bakterium nicht durch eine antimikrobielle Therapie eradiziert wird. Die Kolonisierung des Magens mit *H. pylori* ist mit der Entwicklung schwerer gastrointestinaler Krankheiten wie chronischer aktiver Gastritis sowie Gastral- und Duodenalulkus assoziiert und gilt als Risikofaktor für die Entstehung eines Magenadenokarzinoms.

Neben der Motilität und der Ureaseaktivität ist wenig über Faktoren bekannt, die *H. pylori* das Überleben und die Persistenz in diesem rigiden Lebensraum ermöglichen. Die Methode der „signature tagged mutagenesis“ (STM) bietet die Möglichkeit, viele bakterielle Mutanten simultan in einem Versuchstier auf ihre Fähigkeit zur Kolonisation zu testen.

In dieser Arbeit stellte sich das Infektionsmodell der mongolischen Wüstenrennmaus als geeignet für die Durchführung einer solchen Suche nach *in vivo* für die Kolonisierung essentiellen Genen bei *H. pylori* heraus. Durch die *in vitro*-Transposonmutagenese einer *H. pylori*-Genbank und die Integration der transponierten DNA-Abschnitte in das Genom von *H. pylori* wurden 960 Mutanten erzeugt, die durch ein spezifisch in das Transposon integriertes DNA-Fragment mit einer individuellen Signaturmarke versehen waren.

Die Mutanten wurden in 40 Gruppen mit je 24 Mutanten auf ihre Fähigkeit überprüft, den Magen der Wüstenrennmäuse zu kolonisieren. Die kolonisierenden Mutanten wurden nach erfolgter Reisolierung aus dem Magen mittels einer neu entwickelten, sensitiven und selektiven PCR-Methode anhand ihrer individuellen Signaturmarken identifiziert. Nicht-kolonisierende Mutanten wurden in einer zweiten Infektionsrunde erneut getestet.

Nach der Sequenzierung der Transposoninsertion der nach der zweiten Runde nicht kolonisierenden Mutanten wurden 77 Gene identifiziert, deren Inaktivierung zu einem Verlust der Kolonisierungsfähigkeit führte. 65 dieser Gene waren dabei absolut unerlässlich für die Kolonisierung, bei 12 weiteren wurde eine Attenuierung festgestellt.

Die identifizierten Gene gehören 10 Gruppen mit unterschiedlichen biologischen Funktionen an. Darunter befinden sich Gene, die *in vivo* essentielle Transportprozesse katalysieren, an der Ausstattung und Synthese von Komponenten der Zellhülle beteiligt sind und regulatorische Funktionen besitzen.

Darüberhinaus wurde eine Reihe von Genen identifiziert, deren Genprodukte keine Homologien zu bereits bekannten Proteinen aufweisen und voraussichtlich *H. pylori*-spezifische Kolonisierungsmechanismen kodieren.

Durch die Identifizierung von Genen, die strukturelle sowie akzessorische Komponenten des Flagellensystems und der Urease kodieren, konnte die STM-Suche nach *in vivo* essentiellen Genen von *H. pylori* verifiziert werden.

Das als *in vivo* essentiell identifizierte Gen *hp0169* kodiert für ein Protein, das Homologien zu bakteriellen Kollagenasen aufweist. Durch Untersuchungen an bakteriellen Lysaten, Überständen und durch biochemische Charakterisierung des rekombinant in *E. coli* exprimierten Gens konnte das Protein als metallionenabhängige Kollagenase identifiziert werden, die in den Kulturüberstand von *H. pylori* sezerniert wird. Die Identifikation dieser Kollagenase demonstriert zum ersten Mal, dass *H. pylori* im Magen auf die Degradation von extrazellulären Matrixproteinen zum Überleben in der Magenmukosa angewiesen ist.

Durch diesen funktionellen Genomansatz wurden viele bisher nicht bekannte Magen-Kolonisierungsfaktoren von *H. pylori* identifiziert, die einen detaillierteren Blick auf die molekularen Prozesse der ersten Schritte bei der Infektion zulassen und eine Basis für weitergehende funktionelle Untersuchungen darstellen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Akada, J.K., Shirai, M., Takeuchi, H., Tsuda, M. und Nakazawa, T. (2000) Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH. *Mol. Microbiol.* **36**: 1071-1084.
- Akanuma, M., Maeda, S., Ogura, K., Mitsuno, Y., Hirata, Y., Ikenoue, T., Otsuka, M., Watanabe, T., Yamaji, Y., Yoshida, H., Kawabe, T., Shiratori, Y. und Omata, M. (2002) The evaluation of putative virulence factors of *Helicobacter pylori* for gastroduodenal disease by use of a short-term Mongolian gerbil infection model. *J. Infect. Dis.* **185**: 341-347.
- Alm, R.A., Bina, J., Andrews, B.M., Doig, P., Hancock, R.E. und Trust, T.J. (2000) Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. *Infect. Immun.* **68**: 4155-4168.
- Alm, R.A., Ling, L.S., Moir, D.T., King, B.L., Brown, E.D., Doig, P.C., Smith, D.R., Noonan, B., Guild, B.C., deJonge, B.L., Carmel, G., Tummino, P.J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D.M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S.D., Jiang, Q., Taylor, D.E., Vovis, G.F. und Trust, T.J. (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397**: 176-180.
- Alm, R.A. und Trust, T.J. (1999) Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *J. Mol. Med.* **77**: 834-846.
- Andrews, S.C. (1998) Iron storage in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **40**: 281-351.
- Appelmek, B.J., Martin, S.L., Monteiro, M.A., Clayton, C.A., McColm, A.A., Zheng, P., Verboom, T., Maaskant, J.J., van den Eijnden, D.H., Hokke, C.H., Perry, M.B., Vandenbroucke-Grauls, C.M. und Kusters, J.G. (1999) Phase variation in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide due to changes in the lengths of poly(C) tracts in alpha3-fucosyltransferase genes. *Infect. Immun.* **67**: 5361-5366.
- Appelmek, B.J., Martino, M.C., Veenhof, E., Monteiro, M.A., Maaskant, J.J., Negrini, R., Lindh, F., Perry, M., Del Giudice, G. und Vandenbroucke-Grauls, C.M. (2000) Phase variation in H type I and Lewis a epitopes of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **68**: 5928-5932.
- Appelmek, B.J., Negrini, R., Moran, A.P. und Kuipers, E.J. (1997) Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. *Trends Microbiol.* **5**: 70-73.
- Asahi, M., Azuma, T., Ito, S., Ito, Y., Suto, H., Nagai, Y., Tsubokawa, M., Tohyama, Y., Maeda, S., Omata, M., Suzuki, T. und Sasakawa, C. (2000) *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J. Exp. Med.* **191**: 593-602.

- Ashorn, M., Cantet, F., Mayo, K. und Megraud, F. (2000) Cytoskeletal rearrangements induced by *Helicobacter pylori* strains in epithelial cell culture: possible role of the cytotoxin *Dig. Dis. Sci.* **45**: 1774-1780.
- Backert, S., Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V. und Meyer, T.F. (2001) Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **42**: 631-644.
- Bartilson, M., Marra, A., Christine, J., Asundi, J.S., Schneider, W.P. und Hromockyj, A.E. (2001) Differential fluorescence induction reveals *Streptococcus pneumoniae* loci regulated by competence stimulatory peptide. *Mol. Microbiol.* **39**: 126-135.
- Bedi, G.S. und Williams, T. (1994) Purification and characterization of a collagen-degrading protease from *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.* **269**: 599-606.
- Beil, W., Birkholz, C., Wagner, S. und Sewing, K.F. (1994) Interaction of *Helicobacter pylori* and its fatty acids with parietal cells and gastric H⁺/K⁺-ATPase. *Gut* **35**: 1176-1180.
- Beil, W., Obst, B., Sewing, K.F. und Wagner, S. (2000) *Helicobacter pylori* reduces intracellular glutathione in gastric epithelial cells *Dig. Dis. Sci.* **45**: 1769-1773.
- Bereswill, S., Waidner, U., Odenbreit, S., Lichte, F., Fassbinder, F., Bode, G. und, M. (1998) Structural, functional and mutational analysis of the *pfr* gene encoding a ferritin from *Helicobacter pylori*. *Microbiology* **144**: 2505-2516.
- Berstad, K., Sjødahl, R. und Berstad, A. (1994) Phospholipase A2 activity in gastric juice from patients with active and *H. pylori*-eradicated healed duodenal ulcer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **8**: 175-180.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bukanov, N.O. und Berg, D.E. (1994) Ordered cosmid library and high-resolution physical-genetic map of *Helicobacter pylori* strain NCTC11638 *Mol. Microbiol.* **11**: 509-523.
- Calam, J. (1999) *Helicobacter pylori* modulation of gastric acid. *Yale J. Biol. Med.* **72**: 195-202.
- Camilli, A., Beattie, D.T. und Mekalanos, J.J. (1994) Use of genetic recombination as a reporter of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 2634-2638.
- Cantorna, M.T. und Balish, E. (1990) Inability of human clinical strains of *Helicobacter pylori* to colonize the alimentary tract of germfree rodents. *Can. J. Microbiol.* **36**: 237-241.

- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R. und Covacci, A. (1996) Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 14648-14653.
- Chalker, A.F., Minehart, H.W., Hughes, N.J., Koretke, K.K., Lonetto, M.A., Brinkman, K.K., Warren, P.V., Lupas, A., Stanhope, M.J., Brown, J.R. und Hoffman, P.S. (2001) Systematic identification of selective essential genes in *Helicobacter pylori* by genome prioritization and allelic replacement mutagenesis. *J. Bacteriol.* **183**: 1259-1268.
- Chan, E.C., Chen, K.T. und Lin, Y.L. (1996) Vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* activates cellular signaling and pepsinogen secretion in human gastric adenocarcinoma cells. *FEBS Lett.* **399**: 127-130.
- Chang, G. und Roth, C.B. (2001) Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* **293**: 1793-1800.
- Chevalier, C., Thiberge, J.M., Ferrero, R.L. und Labigne, A. (1999) Essential role of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. *Mol. Microbiol.* **31**: 1359-1372.
- Chiang, S.L. und Mekalanos, J.J. (1998) Use of signature-tagged transposon mutagenesis to identify *Vibrio cholerae* genes critical for colonization. *Mol. Microbiol.* **27**: 797-805.
- Cormack, B.P. und Falkow, S. (1999) Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* **151**: 979-987.
- Coulter, S.N., Schwan, W.R., Ng, E.Y., Langhorne, M.H., Ritchie, H.D., Westbrook-Wadman, S., Hufnagle, W.O., Folger, K.R., Bayer, A.S. und Stover, C.K. (1998) *Staphylococcus aureus* genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. *Mol. Microbiol.* **30**: 393-404.
- Culham, D.E., Dalgado, C., Gyles, C.L., Mamelak, D., MacLellan, S. und Wood, J.M. (1998) Osmoregulatory transporter ProP influences colonization of the urinary tract by *Escherichia coli*. *Microbiology* **144**: 91-102.
- Cullen, D.J., Collins, B.J., Christiansen, K.J., Epis, J., Warren, J.R., Surveyor, I. und Cullen, K.J. (1993) When is *Helicobacter pylori* infection acquired? *Gut* **34**: 1681-1682.
- de Bernard, M., Moschioni, M., Napolitani, G., Rappuoli, R. und Montecucco, C. (2000) The VacA toxin of *Helicobacter pylori* identifies a new intermediate filament-interacting protein *EMBO J.* **19**: 48-56.
- Dhaenens, L., Szczepara, F. und Husson, M.O. (1997) Identification, characterization, and immunogenicity of the lactoferrin-binding protein from *Helicobacter pylori* *Infect. Immun.* **65**: 514-518.

- Doig, P., de Jonge, B.L., Alm, R.A., Brown, E.D., Uria-Nickelsen, M., Noonan, B., Mills, S.D., Tummino, P., Carmel, G., Guild, B.C., Moir, D.T., Vovis, G.F. und Trust, T.J. (1999) *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 675-707.
- Dorrell, N., Martino, M.C., Stabler, R.A., Ward, S.J., Zhang, Z.W., McColm, A.A., Farthing, M.J. und Wren, B.W. (1999) Characterization of *Helicobacter pylori* PldA, a phospholipase with a role in colonization of the gastric mucosa. *Gastroenterology* **117**: 1098-1104.
- Dubois, A., Berg, D.E., Incecik, E.T., Fiala, N., Heman-Ackah, L.M., Perez-Perez, G.I. und Blaser, M.J. (1996) Transient and persistent experimental infection of nonhuman primates with *Helicobacter pylori*: implications for human disease. *Infect. Immun.* **64**: 2885-2891.
- Dubois, A., Fiala, N., Heman-Ackah, L.M., Drazek, E.S., Tarnawski, A., Fishbein, W.N., Perez-Perez, G.I. und Blaser, M.J. (1994) Natural gastric infection with *Helicobacter pylori* in monkeys: a model for spiral bacteria infection in humans. *Gastroenterology* **106**: 1405-1417.
- Dundon, W.G., Polenghi, A., Del Giudice, G., Rappuoli, R. und Montecucco, C. (2001) Neutrophil-activating protein (HP-NAP) versus ferritin (Pfr): comparison of synthesis in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.* **199**: 143-149.
- Dunn, B.E., Cohen, H. und Blaser, M.J. (1997) *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 720-741.
- Dwarakanath, A.D., Tsai, H.H., Sunderland, D., Hart, C.A., Figura, N., Crabtree, J.E. und Rhodes, J.M. (1995) The production of neuraminidase and fucosidase by *Helicobacter pylori*: their possible relationship to pathogenicity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **12**: 213-216.
- Eaton, K.A., Brooks, C.L., Morgan, D.R. und Krakowka, S. (1991) Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* **59**: 2470-2475.
- Eaton, K.A., Suerbaum, S., Josenhans, C. und Krakowka, S. (1996) Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect. Immun.* **64**: 2445-2448.
- Edelstein, P.H., Edelstein, M.A., Higa, F. und Falkow, S. (1999) Discovery of virulence genes of *Legionella pneumophila* by using signature tagged mutagenesis in a guinea pig pneumonia model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 8190-8195.
- Engstrand, L., Scheynius, A., Pahlson, C., Grimelius, L., Schwan, A. und Gustavsson, S. (1989) Association of *Campylobacter pylori* with induced expression of class II transplantation antigens on gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* **57**: 827-832.

- Erdman, S.E., Correa, P., Coleman, L.A., Schrenzel, M.D., Li, X. und Fox, J.G. (1997) *Helicobacter mustelae*-associated gastric MALT lymphoma in ferrets. *Am. J. Pathol.* **151**: 273-280.
- Evans, D.G., Evans, D.J., Jr., Moulds, J.J. und Graham, D.Y. (1988) N-acetylneuraminylactose-binding fibrillar hemagglutinin of *Campylobacter pylori*: a putative colonization factor antigen. *Infect. Immun.* **56**: 2896-2906.
- Evans, D.G., Karjalainen, T.K., Evans, D.J., Jr., Graham, D.Y. und Lee, C.H. (1993) Cloning, nucleotide sequence, and expression of a gene encoding an adhesin subunit protein of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **175**: 674-683.
- Evans, D.J., Jr., Evans, D.G., Takemura, T., Nakano, H., Lampert, H.C., Graham, D.Y., Granger, D.N. und Kviety, P.R. (1995) Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect. Immun.* **63**: 2213-2220.
- Exner, M.M., Doig, P., Trust, T.J. und Hancock, R.E. (1995) Isolation and characterization of a family of porin proteins from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **63**: 1567-1572.
- Fan, X., Gunasena, H., Cheng, Z., Espejo, R., Crowe, S.E., Ernst, P.B. und Reyes, V.E. (2000) *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J. Immunol.* **165**: 1918-1924.
- Finlay, B.B. und Falkow, S. (1989) Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev.* **53**: 210-230.
- Fischer, W., Puls, J., Buhrdorf, R., Gebert, B., Odenbreit, S. und Haas, R. (2001) Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol. Microbiol.* **42**: 1337-1348.
- Fischer, W., Schwan, D., Gerland, E., Erlenfeld, G.E., Odenbreit, S. und Haas, R. (1999) A plasmid-based vector system for the cloning and expression of *Helicobacter pylori* genes encoding outer membrane proteins. *Mol. Gen. Genet.* **262**: 501-507.
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A. und Merrick, J.M. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-512.
- Foryst-Ludwig, A. und Naumann, M. (2000) P21-activated kinase 1 activates the nuclear factor kappa B (NF-kappa B)-inducing kinase-Ikappa B kinases NF-kappa B pathway and proinflammatory cytokines in *Helicobacter pylori* infection. *J. Biol. Chem.* **275**: 39779-39785.
- Fox, J.G., Correa, P., Taylor, N.S., Lee, A., Otto, G., Murphy, J.C. und Rose, R. (1990) *Helicobacter mustelae*-associated gastritis in ferrets. An animal model of *Helicobacter pylori* gastritis in humans. *Gastroenterology* **99**: 352-361.

- Foynes, S., Dorrell, N., Ward, S.J., Stabler, R.A., McColm, A.A., Rycroft, A.N. und Wren, B.W. (2000) *Helicobacter pylori* possesses two CheY response regulators and a histidine kinase sensor, CheA, which are essential for chemotaxis and colonization of the gastric mucosa. *Infect. Immun.* **68**: 2016-2023.
- Foynes, S., Dorrell, N., Ward, S.J., Zhang, Z.W., McColm, A.A., Farthing, M.J. und Wren, B.W. (1999) Functional analysis of the roles of FlhQ and FlhB in flagellar expression in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**: 33-39.
- Frazier, B.A., Pfeifer, J.D., Russell, D.G., Falk, P., Olsen, A.N., Hammar, M., Westblom, T.U. und Normark, S.J. (1993) Paracrystalline inclusions of a novel ferritin containing nonheme iron, produced by the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*: evidence for a third class of ferritins. *J. Bacteriol.* **175**: 966-972.
- Ge, Z., Feng, Y., Dangler, C.A., Xu, S., Taylor, N.S. und Fox, J.G. (2000) Fumarate reductase is essential for *Helicobacter pylori* colonization of the mouse stomach. *Microb. Pathog.* **29**: 279-287.
- Geis, G., Leying, H., Suerbaum, S. und Opferkuch, W. (1990) Unusual fatty acid substitution in lipids and lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 930-932.
- Geis, G., Suerbaum, S., Forsthoff, B., Leying, H. und Opferkuch, W. (1993) Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* **38**: 371-377.
- Gillessen, A. und Domschke, W. (1994) The significance of cytokines and extracellular matrix for stomach ulcer healing. *Z. Gastroenterol.* **32**: 691-693.
- Gooz, M., Gooz, P. und Smolka, A.J. (2001) Epithelial and bacterial metalloproteinases and their inhibitors in *H. pylori* infection of human gastric cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **281**: G823-G832.
- Goryshin, I.Y. und Reznikoff, W.S. (1998) Tn5 *in vitro* transposition. *J. Biol. Chem.* **273**: 7367-7374.
- Graham, D.Y. (1991) *Helicobacter pylori*: its epidemiology and its role in duodenal ulcer disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **6**: 105-113.
- Graham, D.Y. (1998) Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implications for therapy. *Gastroenterology* **115**: 1272-1277.
- Grimwood, B.G., Plummer, T.H., Jr. und Tarentino, A.L. (1994) Purification and characterization of a neutral zinc endopeptidase secreted by *Flavobacterium meningosepticum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **311**: 127-132.
- Grogan, D.W. und Cronan, J.E., Jr. (1986) Characterization of *Escherichia coli* mutants completely defective in synthesis of cyclopropane fatty acids. *J. Bacteriol.* **166**: 872-877.

- Grogan, D.W. und Cronan, J.E., Jr. (1997) Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 429-441.
- Haas, R., Meyer, T.F. und van Putten, J.P. (1993) Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **8**: 753-760.
- Halter, R., Pohlner, J. und Meyer, T.F. (1984) IgA protease of *Neisseria gonorrhoeae*: isolation and characterization of the gene and its extracellular product. *EMBO J.* **3**: 1595-1601.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Haque, M., Hirai, Y., Yokota, K., Mori, N., Jahan, I., Ito, H., Hotta, H., Yano, I., Kanemasa, Y. und Oguma, K. (1996) Lipid profile of *Helicobacter spp.*: presence of cholesteryl glucoside as a characteristic feature. *J. Bacteriol.* **178**: 2065-2070.
- Harrington, D.J. (1996) Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. *Infect. Immun.* **64**: 1885-1891.
- Hazell, S.L., Evans, D.J., Jr. und Graham, D.Y. (1991) *Helicobacter pylori* catalase. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 57-61.
- Hazell, S.L. und Mendz, G.L. (1997) How *Helicobacter pylori* works: an overview of the metabolism of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **2**: 1-12.
- Helicobacter* and Cancer Collaborative Group (2001) Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut* **49**: 347-353.
- Henderson, I.R. und Nataro, J.P. (2001) Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect. Immun.* **69**: 1231-1243.
- Hennig, E.E., Butruk, E. und Ostrowski, J. (2001) RACK1 protein interacts with *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin: the yeast two-hybrid approach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**: 103-110.
- Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M.D., Dalton, E. und Holden, D.W. (1995) Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269**: 400-403.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M. und Hatakeyama, M. (2002) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* **295**: 683-686.

- Hirakata, Y., Srikumar, R., Poole, K., Gotoh, N., Suematsu, T., Kohno, S., Kamihira, S., Hancock, R.E. und Speert, D.P. (2002) Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Exp. Med.* **196**: 109-118.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S. und Haas, R. (2001) Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* **41**: 379-391.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S., Henke, G. und Haas, R. (1998) Natural competence for DNA transformation in *Helicobacter pylori*: identification and genetic characterization of the *comB* locus. *Mol. Microbiol.* **28**: 1027-1038.
- Holmes, D.S. und Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
- IARC Working Group (1994) Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* **61**: 1-241.
- Igwe, E.I., Russmann, H., Roggenkamp, A., Noll, A., Autenrieth, I.B. und Heesemann, J. (1999) Rational live oral carrier vaccine design by mutating virulence-associated genes of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **67**: 5500-5507.
- Ikeno, T., Ota, H., Sugiyama, A., Ishida, K., Katsuyama, T., Genta, R.M. und Kawasaki, S. (1999) *Helicobacter pylori* -induced chronic active gastritis, intestinal metaplasia, and gastric ulcer in Mongolian gerbils. *Am. J. Pathol.* **154**: 951-960.
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I.M., Kersulyte, D., Incecik, E.T., Berg, D.E., Covacci, A., Engstrand, L. und Boren, T. (1998) *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* **279**: 373-377.
- Jenks, P.J., Chevalier, C., Ecobichon, C. und Labigne, A. (2001) Identification of nonessential *Helicobacter pylori* genes using random mutagenesis and loop amplification. *Res. Microbiol.* **152**: 725-734.
- Jenks, P.J., Foynes, S., Ward, S.J., Constantinidou, C., Penn, C.W. und Wren, B.W. (1997) A flagellar-specific ATPase (Flil) is necessary for flagellar export in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**: 205-211.
- Jovanovic, I.R., Milosavjevic, T.N., Jankovic, G.P., Micev, M.M., Dugalic, P.D., Saranovic, D., Ugljesic, M.M., Popovic, D.V. und Bulajic, M.M. (2001) Clinical onset of the Crohn's disease after eradication therapy of *Helicobacter pylori* infection. Does *Helicobacter pylori* infection interact with natural history of inflammatory bowel diseases? *Med. Sci. Monit.* **7**: 137-141.

- Judson, N. und Mekalanos, J.J. (2000) Transposon-based approaches to identify essential bacterial genes. *Trends Microbiol.* **8**: 521-526.
- Karita, M., Kouchiyama, T., Okita, K. und Nakazawa, T. (1991) New small animal model for human gastric *Helicobacter pylori* infection: success in both nude and euthymic mice. *Am. J. Gastroenterol.* **86**: 1596-1603.
- Kili, A.O., Herzberg, M.C., Meyer, M.W., Zhao, X. und Tao, L. (1999) Streptococcal reporter gene-fusion vector for identification of *in vivo* expressed genes. *Plasmid* **42**: 67-72.
- Kim, J.S., Chang, J.H., Chung, S.I. und Yum, J.S. (1999) Molecular cloning and characterization of the *Helicobacter pylori* *flaD* gene, an essential factor in flagellar structure and motility. *J. Bacteriol.* **181**: 6969-6976.
- Kobayashi, H., Kamiya, S., Suzuki, T., Kohda, K., Muramatsu, S., Kurumada, T., Ohta, U., Miyazawa, M., Kimura, N., Mutoh, N., Shirai, T., Takagi, A., Harasawa, S., Tani, N. und Miwa, T. (1996) The effect of *Helicobacter pylori* on gastric acid secretion by isolated parietal cells from a guinea pig. Association with production of vacuolating toxin by *H. pylori*. *Scand. J. Gastroenterol.* **31**: 428-433.
- Komorowska, M., Szafran, H., Popiela, T. und Szafran, Z. (1981) Free amino acids of human gastric juice. *Acta Physiol. Pol.* **32**: 559-567.
- Kowalski, M., Konturek, P.C., Pieniazek, P., Karczewska, E., Kluczka, A., Grove, R., Kranig, W., Nasser, R., Thale, J., Hahn, E.G. und Konturek, S.J. (2001) Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in coronary artery disease and effect of its eradication on coronary lumen reduction after percutaneous coronary angioplasty. *Dig. Liver Dis.* **33**: 222-229.
- Krakowka, S., Morgan, D.R., Kraft, W.G. und Leunk, R.D. (1987) Establishment of gastric *Campylobacter pylori* infection in the neonatal gnotobiotic piglet. *Infect. Immun.* **55**: 2789-2796.
- Kuipers, E.J., Thijs, J.C. und Festen, H.P. (1995) The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **9**: 59-69.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lee, A., Fox, J.G., Otto, G. und Murphy, J. (1990) A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis. *Gastroenterology* **99**: 1315-1323.
- Lee, A., O'Rourke, J., De Ungria, M.C., Robertson, B., Daskalopoulos, G. und Dixon, M.F. (1997) A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* **112**: 1386-1397.

- Lehoux, D.E., Sanschagrin, F. und Levesque, R.C. (1999) Defined oligonucleotide tag pools and PCR screening in signature-tagged mutagenesis of essential genes from bacteria. *Biotechniques* **26**: 473-8.
- Lehoux, D.E., Sanschagrin, F. und Levesque, R.C. (2002) Identification of *in vivo* essential genes from *Pseudomonas aeruginosa* by PCR-based signature-tagged mutagenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **210**: 73-80.
- Logan, R.P. (1994) *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Lancet* **344**: 1078-1079.
- Logan, S.M., Conlan, J.W., Monteiro, M.A., Wakarchuk, W.W. und Altman, E. (2000) Functional genomics of *Helicobacter pylori*: identification of a beta-1,4 galactosyltransferase and generation of mutants with altered lipopolysaccharide. *Mol. Microbiol.* **35**: 1156-1167.
- Lowe, A.M., Beattie, D.T. und Deresiewicz, R.L. (1998) Identification of novel staphylococcal virulence genes by *in vivo* expression technology. *Mol. Microbiol.* **27**: 967-976.
- Maeda, H. (1996) Role of microbial proteases in pathogenesis. *Microbiol. Immunol.* **40**: 685-699.
- Mahan, M.J., Slauch, J.M. und Mekalanos, J.J. (1993) Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* **259**: 686-688.
- Mahan, M.J., Tobias, J.W., Slauch, J.M., Hanna, P.C., Collier, R.J. und Mekalanos, J.J. (1995) Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 669-673.
- Mahdavi, J., Sonden, B., Hurtig, M., Olfat, F.O., Forsberg, L., Roche, N., Angstrom, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K.A., Altraja, S., Wadstrom, T., Kersulyte, D., Berg, D.E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K.E., Norberg, T., Lindh, F., Lundskog, B.B., Arnqvist, A., Hammarstrom, L. und Boren, T. (2002) *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **297**: 573-578.
- Malaty, H.M., Engstrand, L., Pedersen, N.L., and Graham, D.Y. (1994) *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins. *Ann. Intern. Med.* **120**: 982-986.
- Malaty, H.M. und Graham, D.Y. (1994) Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* **35**: 742-745.
- Marchetti, M., Arico, B., Burroni, D., Figura, N., Rappuoli, R. und Ghiara, P. (1995) Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* **267**: 1655-1658.
- Matsumoto, S., Washizuka, Y., Matsumoto, Y., Tawara, S., Ikeda, F., Yokota, Y. und Karita, M. (1997) Induction of ulceration and severe gastritis in Mongolian gerbil by *Helicobacter pylori* infection. *J. Med. Microbiol.* **46**: 391-397.

- McCallion, W.A., Murray, L.J., Bailie, A.G., Dalzell, A.M., O'Reilly, D.P. und Bamford, K.B. (1996) *Helicobacter pylori* infection in children: relation with current household living conditions. *Gut* **39**: 18-21.
- McGee, D.J., Radcliff, F.J., Mendz, G.L., Ferrero, R.L. und Mobley, H.L. (1999) *Helicobacter pylori* *rocF* is required for arginase activity and acid protection *in vitro* but is not essential for colonization of mice or for urease activity. *J. Bacteriol.* **181**: 7314-7322.
- McGowan, C.C., Necheva, A., Thompson, S.A., Cover, T.L. und Blaser, M.J. (1998) Acid-induced expression of an LPS-associated gene in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **30**: 19-31.
- Mecsas, J. (2002) Use of signature-tagged mutagenesis in pathogenesis studies. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 33-37.
- Megraud, F. (1998) Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* infection. *Br. Med. Bull.* **54**: 207-216.
- Mendall, M.A., Goggin, P.M., Molineaux, N., Levy, J., Toosy, T., Strachan, D. und Northfield, T.C. (1992) Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. *Lancet* **339**: 896-897.
- Menz, G.L. und Hazell, S.L. (1995) Aminoacid utilization by *Helicobacter pylori*. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **27**: 1085-1093.
- Mizote, T., Yoshiyama, H. und Nakazawa, T. (1997) Urease-independent chemotactic responses of *Helicobacter pylori* to urea, urease inhibitors, and sodium bicarbonate. *Infect. Immun.* **65**: 1519-1521.
- Mobley, H.L., Garner, R.M. und Bauerfeind, P. (1995) *Helicobacter pylori* nickel-transport gene *nixA*: synthesis of catalytically active urease in *Escherichia coli* independent of growth conditions. *Mol. Microbiol.* **16**: 97-109.
- Mori, N., Wada, A., Hirayama, T., Parks, T.P., Stratowa, C. und Yamamoto, N. (2000) Activation of intercellular adhesion molecule 1 expression by *Helicobacter pylori* is regulated by NF-kappaB in gastric epithelial cancer cells. *Infect Immun* **68**: 1806-1814.
- Moss, S. und Calam, J. (1992) *Helicobacter pylori* and peptic ulcers: the present position. *Gut* **33**: 289-292.
- Moss, S.F., Legon, S., Bishop, A.E., Polak, J.M. und Calam, J. (1992) Effect of *Helicobacter pylori* on gastric somatostatin in duodenal ulcer disease. *Lancet* **340**: 930-932.
- Muotiala, A., Helander, I.M., Pyhala, L., Kosunen, T.U. und Moran, A.P. (1992) Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **60**: 1714-1716.

- Nedenskov, P. (1994) Nutritional requirements for growth of *Helicobacter pylori* *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3450-3453.
- Nikaido, H., Basina, M., Nguyen, V. und Rosenberg, E.Y. (1998) Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those beta-lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *J. Bacteriol.* **180**: 4686-4692.
- Nilsson, H.O., Taneera, J., Castedal, M., Glatz, E., Olsson, R. und Wadstrom, T. (2000) Identification of *Helicobacter pylori* and other *Helicobacter* species by PCR, hybridization, and partial DNA sequencing in human liver samples from patients with primary sclerosing cholangitis or primary biliary cirrhosis. *J. Clin. Microbiol.* **38** : 1072-1076.
- Odenbreit, S., Gebert, B., Puls, J., Fischer, W. und Haas, R. (2001) Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the *cag* pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell. Microbiol.* **3**: 21-31.
- Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W. und Haas, R. (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* **287**: 1497-1500.
- Odenbreit, S., Till, M., Hofreuter, D., Faller, G. und Haas, R. (1999) Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol. Microbiol.* **31**: 1537-1548.
- Ogura, K., Maeda, S., Nakao, M., Watanabe, T., Tada, M., Kyutoku, T., Yoshida, H., Shiratori, Y. und Omata, M. (2000) Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J. Exp. Med.* **192**: 1601-1610.
- Osaki, T., Yamaguchi, H., Taguchi, H., Fukuda, M., Kawakami, H., Hirano, H., Watanabe, S., Takagi, A. und Kamiya, S. (1998) Establishment and characterisation of a monoclonal antibody to inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. *J. Med. Microbiol.* **47**: 505-512.
- Ottlecz, A., Romero, J.J., Hazell, S.L., Graham, D.Y. und Lichtenberger, L.M. (1993) Phospholipase activity of *Helicobacter pylori* and its inhibition by bismuth salts. Biochemical and biophysical studies. *Dig. Dis. Sci.* **38**: 2071-2080.
- Owen, R.J., Martin, S.R. und Borman, P. (1985) Rapid urea hydrolysis by gastric *Campylobacters*. *Lancet* **1**: 111.
- Paques, E.P., Huber, R., Priess, H. und Wright, J.K. (1979) Isolation of the globular region of the subcomponent q of the C1 component of complement. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **360**: 177-183.

- Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A.B., Warnke, R.A., Jellum, E., Orentreich, N., Vogelmann, J.H. und Friedman, G.D. (1994) *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **330**: 1267-1271.
- Peck, B., Ortkamp, M., Diehl, K.D., Hundt, E. und Knapp, B. (1999) Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res.* **27**: 3325-3333.
- Peek, R.M., Jr., Blaser, M.J., Mays, D.J., Forsyth, M.H., Cover, T.L., Song, S.Y., Krishna, U. und Pietenpol, J.A. (1999) *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res.* **59**: 6124-6131.
- Podolsky, D.K. (1999) Mucosal immunity and inflammation. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am. J. Physiol.* **277**: G495-G499.
- Porwollik, S., Noonan, B. und O'Toole, P.W. (1999) Molecular characterization of a flagellar export locus of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **67**: 2060-2070.
- Radin, M.J., Eaton, K.A., Krakowka, S., Morgan, D.R., Lee, A., Otto, G. und Fox, J. (1990) *Helicobacter pylori* gastric infection in gnotobiotic beagle dogs. *Infect. Immun.* **58**: 2606-2612.
- Raghow, R. (1994) The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *FASEB J.* **8**: 823-831.
- Rain, J.C., Selig, L., De Reuse, H., Battaglia, V., Reverdy, C., Simon, S., Lenzen, G., Petel, F., Wojcik, J., Schachter, V., Chemama, Y., Labigne, A. und Legrain, P. (2001) The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* **409**: 211-215.
- Ramarao, N. und Meyer, T.F. (2001) *Helicobacter pylori* resists phagocytosis by macrophages: quantitative assessment by confocal microscopy and fluorescence-activated cell sorting. *Infect. Immun.* **69**: 2604-2611.
- Rawlings, N.D. und Barrett, A.J. (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* **290**: 205-218.
- Rektorschek, M., Weeks, D., Sachs, G. und Melchers, K. (1998) Influence of pH on metabolism and urease activity of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **115**: 628-641.
- Retallack, D.M., Deepe, G.S., Jr. und Woods, J.P. (2000) Applying *in vivo* expression technology (IVET) to the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Microb. Pathog.* **28**: 169-182.
- Reynolds, D.J. und Penn, C.W. (1994) Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. *Microbiology* **140**: 2649-2656.

- Rieder, G., Einsiedl, W., Hatz, R.A., Stolte, M., Enders, G.A. und Walz, A. (2001) Comparison of CXC chemokines ENA-78 and interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Infect. Immun.* **69**: 81-88.
- Roine, R.P., Salmela, K.S., Hook-Nikanne, J., Kosunen, T.U. und Salaspuro, M. (1992) Alcohol dehydrogenase mediated acetaldehyde production by *Helicobacter pylori*-a possible mechanism behind gastric injury. *Life Sci.* **51**: 1333-1337.
- Rokkas, T., Ladas, S., Liatsos, C., Petridou, E., Papatheodorou, G., Theocharis, S., Karameris, A. und Raptis, S. (1999) Relationship of *Helicobacter pylori* CagA status to gastric cell proliferation and apoptosis. *Dig. Dis. Sci.* **44**: 487-493.
- Russmann, H., Adler, K., Haas, R., Gebert, B., Koletzko, S. und Heesemann, J. (2001) Rapid and accurate determination of genotypic clarithromycin resistance in cultured *Helicobacter pylori* by fluorescent *in situ* hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 4142-4144.
- Salama, N., Guillemin, K., McDaniel, T.K., Sherlock, G., Tompkins, L. und Falkow, S. (2000) A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 14668-14673.
- Salama, N.R., Otto, G., Tompkins, L. und Falkow, S. (2001) Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect. Immun.* **69**: 730-736.
- Sawada, Y., Yamamoto, N., Sakagami, T., Fukuda, Y., Shimoyama, T., Nishigami, T., Uematsu, K. und Nakagawa, K. (1999) Comparison of pathologic changes in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils and humans. *J. Gastroenterol.* **34**: 55-60.
- Schmitt, W. und Haas, R. (1994) Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol.* **12**: 307-319.
- Schneider, W.P., Ho, S.K., Christine, J., Yao, M., Marra, A. und Hromockyj, A.E. (2002) Virulence gene identification by differential fluorescence induction analysis of *Staphylococcus aureus* gene expression during infection-simulating culture. *Infect. Immun.* **70**: 1326-1333.
- Schwan, W.R., Coulter, S.N., Ng, E.Y., Langhorne, M.H., Ritchie, H.D., Brody, L.L., Westbrook-Wadman, S., Bayer, A.S., Folger, K.R. und Stover, C.K. (1998) Identification and characterization of the PutP proline permease that contributes to *in vivo* survival of *Staphylococcus aureus* in animal models. *Infect. Immun.* **66**: 567-572.
- Scott, D.R., Weeks, D., Hong, C., Postius, S., Melchers, K. und Sachs, G. (1998) The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **114**: 58-70.
- Selbach, M., Moese, S., Hauck, C.R., Meyer, T.F. und Backert, S. (2002) Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **277**: 6775-6778.

- Shea, J.E., Santangelo, J.D. und Feldman, R.G. (2000) Signature-tagged mutagenesis in the identification of virulence genes in pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 451-458.
- Shomer, N.H., Dangler, C.A., Whary, M.T. und Fox, J.G. (1998) Experimental *Helicobacter pylori* infection induces antral gastritis and gastric mucosa-associated lymphoid tissue in guinea pigs. *Infect. Immun.* **66**: 2614-2618.
- Simoons-Smit, I.M., Appelmek, B.J., Verboom, T., Negrini, R., Penner, J.L., Aspinall, G.O., Moran, A.P., Fei, S.F., Shi, B.S., Rudnica, W., Savio, A. und de Graaff, J. (1996) Typing of *Helicobacter pylori* with monoclonal antibodies against Lewis antigens in lipopolysaccharide. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2196-2200.
- Skouloubris, S., Labigne, A. und De Reuse, H. (1997) Identification and characterization of an aliphatic amidase in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **25**: 989-998.
- Skouloubris, S., Thiberge, J.M., Labigne, A. und De Reuse, H. (1998) The *Helicobacter pylori* Urel protein is not involved in urease activity but is essential for bacterial survival *in vivo*. *Infect. Immun.* **66**: 4517-4521.
- Sleator, R.D. und Hill, C. (2002) Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 49-71.
- Smith, H. (1998) What happens to bacterial pathogens *in vivo*? *Trends Microbiol.* **6**: 239-243.
- Sommi, P., Ricci, V., Fiocca, R., Necchi, V., Romano, M., Telford, J.L., Solcia, E. und Ventura, U. (1998) Persistence of *Helicobacter pylori* VacA toxin and vacuolating potential in cultured gastric epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **275**: G681-G688.
- Spiegelhalder, C., Gerstenecker, B., Kersten, A., Schiltz, E. und Kist, M. (1993) Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infect. Immun.* **61**: 5315-5325.
- Spohn, G. und Scarlato, V. (1999) Motility of *Helicobacter pylori* is coordinately regulated by the transcriptional activator FlgR, an NtrC homolog. *J. Bacteriol.* **181**: 593-599.
- Staib, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Kohler, G., Michel, S., Hof, H., Hacker, J. und Morschhauser, J. (1999) Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans* during infection. *Mol. Microbiol.* **32** : 533-546.
- Stein, M., Rappuoli, R. und Covacci, A. (2000) Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 1263-1268.
- Stern, A., Brown, M., Nickel, P. und Meyer, T.F. (1986) Opacity genes in *Neisseria gonorrhoeae*: control of phase and antigenic variation. *Cell* **47**: 61-71.

- Stingl, K., Uhlemann Em, E.M., Deckers-Hebestreit, G., Schmid, R., Bakker, E.P. und Altendorf, K. (2001) Prolonged survival and cytoplasmic pH homeostasis of *Helicobacter pylori* at pH 1. *Infect. Immun.* **69**: 1178-1180.
- Suerbaum, S. (1995) The complex flagella of gastric *Helicobacter* species. *Trends Microbiol.* **3**: 168-170.
- Suerbaum, S., Josenhans, C. und Labigne, A. (1993) Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* *flaB* flagellin genes and construction of *H. pylori* *flaA*- and *flaB*-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J. Bacteriol.* **175**: 3278-3288.
- Szabo, I., Brutsche, S., Tombola, F., Moschioni, M., Satin, B., Telford, J.L., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E. und Zoratti, M. (1999) Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J.* **18**: 5517-5527.
- Tanahashi, T., Kita, M., Kodama, T., Yamaoka, Y., Sawai, N., Ohno, T., Mitsufuji, S., Wei, Y.P., Kashima, K. und Imanishi, J. (2000) Cytokine expression and production by purified *Helicobacter pylori* urease in human gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* **68**: 664-671.
- Tanaka, S., Meiselman, H.H., Engel, E., Guth, P.H., Furukawa, O., Wenby, R.B., Lee, J. und Kaunitz, J.D. (2002) Regional differences of H⁺, HCO₃⁻, and CO₂ diffusion through native porcine gastroduodenal mucus. *Dig. Dis. Sci.* **47**: 967-973.
- The Eurogast Study Group (1993) An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Lancet* **341**: 1359-1362.
- Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D. und Venter, J.C. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**: 539-547.
- Tonello, F., Dundon, W.G., Satin, B., Molinari, M., Tognon, G., Grandi, G., Del Giudice, G., Rappuoli, R. und Montecucco, C. (1999) The *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein is an iron-binding protein with dodecameric structure. *Mol. Microbiol.* **34**: 238-246.
- Travis, J. und Potempa, J. (2000) Bacterial proteinases as targets for the development of second-generation antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**: 35-50.
- Trebesius, K., Panthel, K., Strobel, S., Vogt, K., Faller, G., Kirchner, T., Kist, M., Heesemann, J. und Haas, R. (2000) Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent *in situ* hybridisation. *Gut* **46**: 608-614.

- Turner, T.A., Logan, R.P., Chinnery, R., Cockayne, A., Hawkey, C.J. und Borriello, S.P. (1997) Trefoil peptides are unique chemotaxins for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **112**: A1107.
- Vaira, D., Holton, J., Ricci, C., Basset, C., Gatta, L., Perna, F., Tampieri, A. und Miglioli, M. (2002) *Helicobacter pylori* infection from pathogenesis to treatment-a critical reappraisal. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16**: 105-113.
- Vaira, D., Miglioli, M., Mule, P., Holton, J., Menegatti, M., Vergura, M., Biasco, G., Conte, R., Logan, R.P. und Barbara, L. (1994) Prevalence of peptic ulcer in *Helicobacter pylori* positive blood donors. *Gut* **35**: 309-312.
- Valdivia, R.H. und Falkow, S. (1997) Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* **277**: 2007-2011.
- Valkonen, K.H., Wadstrom, T. und Moran, A.P. (1994) Interaction of lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* with basement membrane protein laminin. *Infect. Immun.* **62**: 3640-3648.
- Velayudhan, J., Hughes, N.J., McColm, A.A., Bagshaw, J., Clayton, C.L., Andrews, S.C. und Kelly, D.J. (2000) Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol. Microbiol.* **37**: 274-286.
- Waidner, B., Greiner, S., Odenbreit, S., Kavermann, H., Velayudhan, J., Stahler, F., Guhl, J., Bisse, E., van Vliet, A.H., Andrews, S.C., Kusters, J.G., Kelly, D.J., Haas, R., Kist, M. und Bereswill, S. (2002) Essential role of ferritin Pfr in *Helicobacter pylori* iron metabolism and gastric colonization. *Infect. Immun.* **70**: 3923-3929.
- Wang, J., Mushegian, A., Lory, S. und Jin, S. (1996) Large-scale isolation of candidate virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* by *in vivo* selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 10434-10439.
- Ward, C.K., Lumbley, S.R., Latimer, J.L., Cope, L.D. und Hansen, E.J. (1998) *Haemophilus ducreyi* secretes a filamentous hemagglutinin-like protein. *J. Bacteriol.* **180**: 6013-6022.
- Watanabe, T., Tada, M., Nagai, H., Sasaki, S. und Nakao, M. (1998) *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology* **115**: 642-648.
- Weber, K. und Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412.
- Weeks, D.L., Eskandari, S., Scott, D.R. und Sachs, G. (2000) A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* **287**: 482-485.
- Windle, H.J. und Kelleher, D. (1997) Identification and characterization of a metalloprotease activity from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **65**: 3132-3137.

- Wirth, H.P., Beins, M.H., Yang, M., Tham, K.T. und Blaser, M.J. (1998) Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant *Helicobacter pylori* strains. *Infect. Immun.* **66**: 4856-4866.
- Yokota, K., Kurebayashi, Y., Takayama, Y., Hayashi, S., Isogai, H., Isogai, E., Imai, K., Yabana, T., Yachi, A. und Oguma, K. (1991) Colonization of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of Mongolian gerbils. *Microbiol. Immunol.* **35**: 475-480.
- Yuan, Y., Lee, R.E., Besra, G.S., Belisle, J.T. und Barry, C.E., III (1995) Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 6630-6634.
- Zgurskaya, H.I. (2002) Molecular analysis of efflux pump-based antibiotic resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**: 95-105.
- Zhao, H., Li, X., Johnson, D.E. und Mobley, H.L. (1999) Identification of protease and *rpoN*-associated genes of uropathogenic *Proteus mirabilis* by negative selection in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Microbiology* **145**: 185-195.
- Zhou, Z., White, K.A., Polissi, A., Georgopoulos, C. und Raetz, C.R. (1998) Function of *Escherichia coli* MsbA, an essential ABC family transporter, in lipid A and phospholipid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **273**: 12466-12475.
- Zhu, J., Quyyumi, A.A., Muhlestein, J.B., Nieto, F.J., Horne, B.D., Zalles-Ganley, A., Anderson, J.L. und Epstein, S.E. (2002) Lack of association of *Helicobacter pylori* infection with coronary artery disease and frequency of acute myocardial infarction or death. *Am. J. Cardiol.* **89**: 155-158.

7 ANHANG

7.1 Untersuchungen zur Motilität und Ureaseaktivität von *H. pylori*-STM-Mutanten

Die experimentellen Daten zur Untersuchung der Motilität und der Ureaseaktivität (siehe 3.1.8.4) ausgewählter, in dieser Arbeit verwendeter, *H. pylori*-Mutanten sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Motilität und Ureaseaktivität ausgewählter *H. pylori*-Mutanten

Signatur	Signatur-Nr.	HP-Orf	Gen	Motilitätstest Hofduchmesser nach drei Tagen [cm]	Urease-Test
3	8	17	<i>virB4</i>	0,8	+
4	38	18		1,1	+
48	6	36		1	+
26	36	55	<i>putP</i>	0,9	+
45	17	67	<i>ureH</i>	1,2	+
48	7	67	<i>ureH</i>	0,4	+
30	20	71	<i>ureI</i>	1	+
16	28	72	<i>ureB</i>	1	-
4	9	73	<i>ureA</i>	1,1	-
21	19	139		0,4	+
22	37	153	<i>recA</i>	1	+
45	31	169	<i>priC</i>	1	+
45	32	169	<i>priC</i>	0,9	+
30	30	210	<i>htpG</i>	1,1	+
54	29	217		1	+
4	26	232		1,1	+
21	4	235		0,7	+
64	13	237	<i>hemC</i>	0,3	+
4	18	245		0,3	+
22	3	245		0,3	+
22	24	245		0,3	+
26	4	245		0,3	+
4	37	252	<i>omp7</i>	0,6	+
3	6	254	<i>omp8</i>	0,6	+
30	17	254	<i>omp8</i>	0,6	+
30	17	254	<i>omp8</i>	0,6	+
22	8	264	<i>clpB</i>	1	+
7	28	288		1,2	+
64	15	289	<i>vacA</i> -Paralog	0,3	+
64	29	289	<i>vacA</i> -Paralog	0,3	+
7	5	295	<i>flgL</i>	0,3	+

7	25	295	<i>flgL</i>	0,3	+
21	16	298	<i>dppA</i>	1,1	+
62	36	304		0,7	+
4	25	325	<i>flgH</i>	0,3	+
45	21	350		1,2	+
13	26	351	<i>fliF</i>	0,4	+
64	38	360	<i>galE</i>	0,4	+
7	16	363	<i>pcm</i>	1,1	+
48	30	366		0,3	+
4	5	367		0,3	+
4	33	367		0,4	+
16	27	367		0,3	+
54	8	368		0,9	+
3	28	392	<i>cheA</i>	0,3	+
3	2	393	<i>cheV</i>	1,2	+
7	27	397	<i>serA</i>	1,2	+
30	3	415		1,1	+
7	33	416	<i>cfa</i>	0,3	+
21	18	486		1,2	+
3	39	601	<i>flaA</i>	0,3	+
20	11	601	<i>flaA</i>	0,3	+
20	26	601	<i>flaA</i>	0,3	+
3	15	610	<i>vacA-Paralog</i>	1,3	+
3	22	635		1	+
21	29	685	<i>fliP</i>	1,2	+
44	30	686	<i>fecA</i>	1	+
13	13	692	<i>yxjE</i>	1,2	+
4	2	714	<i>rpoN</i>	0,3	-
4	24	752	<i>fliD</i>	0,4	+
21	31	753	<i>fliS</i>	1,3	+
4	14	754		0,7	+
4	8	758		1,1	+
22	4	788	<i>omp</i>	1,2	+
22	35	788		1,1	+
4	17	797	<i>hpaA</i>	1,1	+
21	34	870	<i>flgE</i>	0,3	+
31	17	872	<i>phnA</i>	0,3	+
22	15	874		1,2	+
4	16	875	<i>katA</i>	1,3	+
62	28	907	<i>flgD</i>	0,3	+
62	8	922	<i>vacA-Paralog</i>	1,3	+
7	1	923	<i>omp22</i>	1	+
3	9	930	<i>surE</i>	1	+
62	32	973		1	+
30	27	1082	<i>msbA</i>	1	+
31	18	1091	<i>kgtP</i>	0,9	+
64	21	1092	<i>flgG</i>	0,3	+
11	18	1119	<i>flgK</i>	0,3	+
21	25	1175		1,1	+

7	36	1177	<i>omp27</i>	1,2	+
22	11	1186		0,3	+
54	30	1206	<i>hetA</i>	1	+
4	23	1250		1,2	+
54	20	1274	<i>pflA</i>		+
41	26	1359		0,9	+
47	7	1363		1,2	+
48	24	1420	<i>fliI</i>	0,4	+
11	19	1421	<i>trbB</i>	0,9	+
45	28	1421	<i>trbB</i>	1	+
21	30	1440		1,2	+
62	27	1454		0,3	+
22	33	1486	<i>chimp</i>	0,3	+
4	40	1487	<i>chimp</i>	0,9	+
26	17	1506	<i>gltS</i>	0,3	+
54	31	1506	<i>gltS</i>	1,1	+
16	5	1525		1,5	+
22	36	1525		1,3	+
44	5	1558	<i>flgC</i>	0,3	+
21	38	1576		1	+
Q1 $\Delta comB9$			<i>comB9</i>	1,3	+
Q1 $\Delta comB10$			<i>comB10</i>	1,1	+
Q1 WT				1,3	+

+ = Urease-positiv, - = Urease-negativ

Lebenslauf

geboren: 29.06.1971 in Melle

Schul Ausbildung:

1978-1982	Grundschule Wellingholzhausen
1982-1984	Orientierungsstufe Neuenkirchen
1984-1991	Gymnasium Melle mit Abschluß Abitur

Zivildienst:

1991-1992	Betreuende Tätigkeit in der Pädagogischen Bildungsstätte für geistig und körperlich behinderte Kinder und Jugendliche, Melle. Träger: Heilpädagogische Hilfe, Osnabrück
-----------	---

Studium und Promotion:

10/1992-2/1998:	Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen Prüfung in den Fächern: Mikrobiologie, Biochemie, organische Chemie
2/1998-3/1999:	Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema: „Überproduktion, Reinigung und immunologischer Nachweis der A-ATPase Untereinheit Aha1 aus <i>Methanosarcina mazei</i> Gö1“ als externe Arbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Müller.
seit 4/1999:	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation.

Danksagung

Zunächst danke ich Prof. Rainer Haas für die Bereitstellung des Themas, die Unterstützung während der gesamten Arbeit und die Diskussionsbereitschaft.

Besondes möchte ich mich bei Prof. Volker Müller für die Vertretung meiner Dissertation an der Fakultät für Biologie der LMU und das Interesse am Fortgang der Arbeit bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung des Projekts sei Altana Pharma Deutschland gedankt. Hier sei besonders die Betreuung und Unterstützung des Projekts von Dr. Klaus Melchers und Dr. Klaus Bensch genannt.

Christian Künzel und Silke Birkmann sei für die hervorragende Unterstützung bei den Tierexperimenten gedankt.

Vielen Dank an Katrin, Brendan, Wolfgang, Stefan und Evelyn, die am STM-Projekt beteiligt waren. Ein besonderer Dank gilt dabei Wolfgang für die Einführung in die „*Helicobacter*-Welt“ und die Betreuung der Arbeit.

Für die angenehme Atmosphäre, die fachlichen und privaten Diskussionen und die Aktivitäten außerhalb des Labors möchte ich mich bei allen Mitgliedern der *Helicobacter*-Gruppe bedanken.

Vielen Dank Smurf für die vielen abendlichen Gespräche über Fachliches und Privates.

Imke möchte ich besonders für die strenge und gründliche Durchsicht des Manuskripts danken.

Letztlich möchte ich meinen Eltern ganz herzlich für Ihre Unterstützung während des gesamten Studiums danken.